Aus dem Institut für Rechtsmedizin der
Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H. Schweitzer

Möglichkeiten und Grenzen einer Kombination aus präparativer Gaschromatographie mit prinzipiell anderen Methoden bei der Identifikation unbekannter Pharmazeutika in der forensischen Toxikologie

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

UWE BRINKMANN

1983

RIJKS-
UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der
Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H. Schweitzer

Möglichkeiten und Grenzen einer Kombination aus präparativer Gaschromatographie mit prinzipiell anderen Methoden bei der Identifikation unbekannter Pharmazeutika in der forensischen Toxikologie

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

UWE BRINKMANN

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität Düsseldorf

Der Dekan der Med.
Fakultät der Universität
Düsseldorf

gez.:
Prof. Dr. Hopf

Referent

gez.:
Prof. Dr. Schweitzer

Coreferent

gez.:
Prof. Dr. Staib

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Hauptteil	4
2.1.	Aufgabenstellung	4
2.2.	Theoretische Anforderung an die Einzelkomponenten	5
2.2.1.	Überlegungen zum Injektorsystem	5
2.2.2.	Anforderungen an die Säule	9
2.2.3.	Aufbau des Auslaßsystems	18
3.	Material und Methodik	23
3.1.	Material	23
3.2.	Liste der Änderungen	24
3.3.	Methodik	26
3.3.1.	Voreinstellungen	26
3.3.1.1.	Gasdruck	26
3.3.1.2.	Perlenspannung	27
3.3.1.3.	Temperaturen	27
3.3.1.4.	Ausführungsrohr	27
3.3.2.	Säulenfüllung	28
3.3.3.	Injektionstechnik	28
3.3.4.	Präparation	29
3.3.4.1.	Rückgewinnung	29
3.3.4.2.	UV-Messung	3o
3.3.4.3.	Vorbereitung zur Massenspektrometrie	3o
4.	Praktische Vorversuche	31
4.1.	Einstellung des NFID	31
4.2.	Ermittlung der Nachweisgrenze	32
4.3.	Heizstrom und Ableitrohr	34
4.4.	Zeitliche Verzögerung im Ableitrohr	36
4.5.	Eichung der UV-Spektroskopie	37
4.5.1.	Meßverfahren	37
4.5.2.	pH-Einstellung	39
4.5.3.	Fehlermöglichkeiten	39

Seite

4.6. Injektoroptimierung 4o
4.6.1. Kaltstellen 41
4.6.2. Katalyse 41
4.6.3. Injektionsnadel 41
4.7. Sammelgefäße und Kühlung 42

5. Praktische Ergebnisse mit der Routinemethode 44
5.1. Bromazepam 44
5.2. Coffein 47
5.3. Amitriptylin 48
5.4. Amphetamin 49
5.5. Antipyrin 5o
5.6. Atropin 51
5.7. Chlorpromazin 52
5.8. Chlorprotixen 53
5.9. Clomethiazol 54
5.1o. Diazepam 54
5.11. Ephedrin 56
5.12. Hexobarbital 58
5.13. Imipramin 59
5.14. Lidocain 6o
5.15. Lorazepam 61
5.16. Methaqualon 62
5.17. Morphin 63
5.18. Parathionmethyl 64
5.19 Pentazocin 64
5.2o. Pethidin 67
5.21. Phenacetin 68
5.22. Phenobarbital 69
5.23. Phenytoin 7o
5.24. Cocain 71

6. Ergebnisse aus nicht standardisierten Versuchen 73
6.1. 5,5-Diäthylbarbitursäure 73
6.2. 1-Phenyl-3-methyl-pyrazolon 74

Seite

6.3. Diphenhydramin 75
6.4. Antipyrin 76
6.5. Phenylbutazon 76

7. Versuche mit Hochtemperaturprogramm 78
7.1. Dextromoramid und Fenetyllin 78

8. Trennung zweier Reinsubstanzen 8o
8.1. Coffein und Clomethiazol 8o

9. Isolation von Clomethiazol aus Leberextrakt 82

1o. Diskussion der Ergebnisse 83
1o.1. Stoffauswahl 83
1o.2. Methodisch bedingte Einschränkungen 83
1o.3. Apparative Voraussetzungen 84
1o.4. Handhabung und Fehlerquellen 85
1o.5. Thermolyse und Katalyse 87
1o.6. Dichtungen 87
1o.7. Praktikabilität 88
1o.8. Ergebnisse anderer Autoren 89
1o.9. Wertung der Ergebnisse 9o

11. Zusammenfassung 91

12. Literaturverzeichnis 94

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0029

1. Einleitung

Die Gaschromatographie (im folgenden als GC abgekürzt) hat, obgleich eine der jüngsten Analysenmethoden, in den letzten beiden Jahrzehnten in der Laborroutine größte Bedeutung erlangt. Gerade im toxikologischen Labor, wo es darauf ankommt, in dem reichhaltigen Stoffegemisch einer Körperflüssigkeit einzelne Medikamentenwirkstoffe nachzuweisen, hat sich die GC unentbehrlich gemacht.

Diese Vorteile werden durch eine im Prinzip sehr einfache Methode erreicht: Die zu analysierende Substanz wird verdampft und streicht, gelöst von einem Trägergas, in einem Rohr an der Oberfläche einer stationären Phase vorbei, so daß sich durch Diffusion ein Lösungsgleichgewicht zwischen der Gasphase und der stationären Phase einstellen kann. Stoffe, die sehr schlecht in der stationären Phase löslich sind, bewegen sich nun annähernd mit der Geschwindigkeit des Trägergases, in dem sie gelöst sind. Stoffe mit Affinität zur stationären Phase werden hingegen von dieser festgehalten und nur langsam vom Trägergas mitgenommen. So kommen mit der Zeit alle in dem Gemisch enthaltenen Komponenten an einem Detektor an. Unter standardisierten Bedingungen ist die Zeit zwischen Verdampfung und Nachweis im Detektor eine stoffspezifische Konstante, die zur Identifikation der Komponente dienen kann.

Trotz aller Klarheit in der Theorie ist die Konstanz aller

Randbedingungen nur unter größtem Aufwand gewährleistet und selbst dann bleibt die GC " mehr eine Kunst als eine exakte Wissenschaft." (KAISER, 1973).

Insbesondere die beiden folgenden Einschränkungen sind bei der Bewertung der Aussagekraft eines Gaschromatogramms zu bedenken:

1. Die Retentionszeiten sind von einer Vielzahl von Variablen abhängig, so von der Temperatur, der Gasgeschwindigkeit, dem Querschnitt der Säule und von der Art der stationären Phase etc.!. Die gleiche Substanz kommt also nicht immer zur selben Zeit.

2. Weiterhin ist aber auch bei gleicher Zeit die Substanz nicht eindeutig identifiziert, denn ein anderer Stoff mit einer fast gleichen, d.h. innerhalb der Meßgenauigkeit liegenden Retentionszeit läßt sich nicht ohne weitere Untersuchungen ausschließen.

Dem ersten Problem kann durch Gewissenhaftigkeit und Mitführung einer Referenzsubstanz begegnet werden.
Das zweite ist ein grundsätzliches Problem jeder Chromatographie, welches es immer erforderlich macht, mit prinzipiell anderen Methoden oder auch nur anderen Säulenmateralien Parallelbestimmungen durchzuführen, um das Ergebnis zu sichern.

Praktisch werden aus diesem Grunde in toxikologischen Laboratorien verschiedene analytische Verfahren kombiniert,

z.B. Mehrfachbestimmungen mit DC, GC und HPLC (DALDRUP et al. 1981) bzw. die Kombination von Chromatographie mit spektrometrischen Methoden (UV, IR, MS) oder enzymatische Analysen. Erst bei Übereinstimmung der verschiedenen Meßverfahren ist die Wahrscheinlichkeit hoch genug, die richtige Substanz identifiziert zu haben.

Oft genug stellen sich aber bei der vergleichenden Auswertung insbesondere chromatographischer Daten Schwierigkeiten ein, da wegen unterschiedlicher Detektoren oder Nachweisgrenzen ein erhaltenes Signal nicht eindeutig einer Substanz zugeordnet werden kann.

Günstig ist es, die Kopplungsfähigkeit der GC mit anderen Analysemethoden, insbesondere der Massenspektrometrie, auszunutzen, da hierdurch eine eindeutige Identifizierung der chromatographisch getrennten Substanzen anhand des Spektrums möglich wird.

Eine Kopplung im Sinne einer Parallelbestimmung reicht nicht aus, da die Zuordnungsprobleme bestehen bleiben.

Um die relativ störunempfindlichere und einfachere Methode der GC mit der eindeutigen Identifikation der Massenspektrometrie zu verbinden, ist es möglich, eine im NFID entdeckte Substanz von anderen störenden Faktoren chromatographisch zu isolieren, und diese anschließend im Massenspektrum zu identifizieren.

Durch die Anreicherung bzw. sogar Isolation der fraglichen Substanz mit der präparativen GC entfällt das Problem der vergleichenden Interpretation weitgehend, da diese Substanz rein quantitativ bei jeder weiteren Messung im Vordergrund steht.

Da das MS für Stoffe niedrigen Molekulargewichtes oft eine geringere Empfindlichkeit als der NFID hat, muß jedoch eine genügend große Substanzmenge isoliert werden.

2. H a u p t t e i l

2.1. Aufgabenstellung:

Es soll untersucht werden, ob die Isolation unbekannter Substanzpeaks im Gaschromatogramm mit den Mitteln der präparativen GC eine Hilfe bei der Identifikation sein kann.
Hierzu soll ein handelsüblicher analytischer Gaschromatograph so umgerüstet werden, daß eine Präparation in Microgramm-Mengen möglich wird.

Nach Austestung der Apparatur sollte ein Routineverfahren erstellt werden, mit dem auch unidentifizierte Substanzen

isoliert und verlustarm zum Massenspektrometer überführt werden können.

Um einen analytischen GC zweckentsprechend umzurüsten, sind zunächst einige Überlegungen anzustellen, da die Präparation in einigen Punkten andere Anforderungen stellt als die Analyse.

2.2. Theoretische Anforderungen an die Einzelkomponenten

2.2.1. Überlegungen zum Injektorsystem

Jede Trennung mittels GC beginnt mit der Überführung des Stoffgemisches in die Gasphase, so daß es, gelöst in einem Trägergas, durch die Trennsäule strömt. Diese Aufgabe erfüllt in der Regel eine kleine Kammer, der Injektor, in den durch eine Spritze die Substanz eingeführt werden kann und aus der das Trägergas die verdampfte Substanz ausspült und zur Säule überführt.

Grundsätzlich ist für eine schnelle, restlose Verdampfung der Substanz Sorge zu tragen, da die am Ende der Trennsäule auftretende Einzelkomponente nie in einem kleineren Zeit-

intervall (= Peakbreite) zusammengedrängt sein kann, als das Gemisch Zeit benötigt hat, um in die Gasphase überzutreten.

Unter der hypothetischen Annahme, die Konzentrationsverteilung nach der Verdampfung sei entlang der Trägergassäule "Normalverteilt", läßt sich dieser Sachverhalt an der folgenden Skizze verdeutlichen.

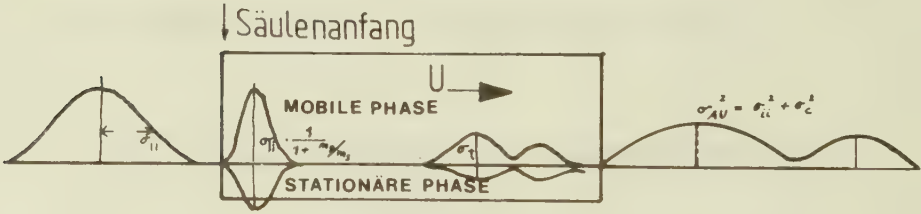


Abb. 1

Abb. 1 : Modifiziert nach PRETORIUS und De CLERK, 1971, zeigt von links (Injektor) nach rechts (Detektor) die räumliche Verteilung einer injizierten Substanz im Verlauf einer Präparation.

m_g = Im Gas gelöste Masse

m_s = In der stat. Phase gelöste Masse

σ_{ii} = Varianz der Verteilungskurve im Injektor

σ_{AU} = Varianz der Verteilungskurve direkt hinter dem Säulenende

σ_c = Varianz, die durch Verteilungsunregelmäßigkeiten in der Säule erzeugt wird.

U = Gasfluß

Die Varianz der Konzentrationsverteilungskurve kann keinesfalls am Ende der Säule kleiner sein als durch die Verdampfung festgelegt, da sich die Gesamtvarianz zusammensetzt aus derjenigen am Einlaß der Säule und der Varianz, die durch Diffusion, Verwirbelung und andere Effekte im Verlauf der Säule erzeugt wird.

Um die räumliche Dispersion des Substanzbolus schon am Eingang möglichst gering zu halten, ist eine möglichst kurze Verdampfungszeit anzustreben.

Bei analytischer Arbeit kann die verdampfte Menge sehr klein bleiben und so gelingt es relativ einfach, dieser Anforderung gerecht zu werden. Bei präparativer Aufgabenstellung muß jedoch sichergestellt sein, daß auch größere Mengen schnell verdampft werden. Die Verdampfungsgeschwindigkeit kann jedoch nicht durch beliebig hohe Injektortemperaturen erzwungen werden, da sich manche Stoffe, wie etwa hydrolysiertes Bromazepam, schon bei einer geringfügig über ihrem Siedepunkt liegenden Temperatur zersetzen. Außerdem wird die Geschwindigkeit durch das Konzentrationsmaximum, das nicht überschritten werden darf, ohne daß Peakverbreiterung durch "Überladung" der Säule auftritt, begrenzt.
Die erste Anforderung an den Injektor besteht also in einer hohen Wärmekapazität und gutem Kontakt zur eingespritzten Substanz, um so mit nur geringer Differenz zwischen Injektortemperatur und Siedepunkt eine schnelle und gleichmäßige

Verdampfung zu erzielen. Dies ist auch deshalb erforderlich, weil nicht verdampfte, mitgerissene Tröpfchen die stationäre Phase eventuell ablösen und damit die Oberfläche des Trägermaterials mit ihren nicht erwünschten physikalischen und katalytischen Eigenschaften freilegen würden.

Über die Erfordernisse für den Verdampfungsprozeß gibt es noch diverse theoretische Überlegungen (GROB, 1977), die hier auszuführen jedoch unnötig erscheint, da die zugrundeliegenden Effekte erst bei Präparation erheblich größerer Mengen Einfluß gewinnen, als in der vorliegenden Arbeit angestrebt wurde.

Weitere Anforderungen an einen guten Injektorteil gelten auch für analytische Zwecke:

1. Gute Temperaturstabilität ohne lokale Überhitzung.
2. Möglichst geringes Volumen, um Diffusionseffekte und diskontinuierliche Verteilung zu vermeiden.

3. Gasdichte Öffnung für das Einführen einer Spritzennadel, um Trägergasverunreinigung oder Probenverlust durch Leckströmung zu vermeiden.

Die unter Punkt 2 genannte Forderung wird wiederum bei präparativen Arbeiten eingeschränkt durch die Notwendigkeit,

für die Verdampfung von großen Lösungsmittelmengen genügend Volumen zur Verfügung zu haben, um momentane Überdrucke durch den Dampfdruck der eingeführten Substanzen abzufangen. Deshalb sollte das Volumen der verdampften Substanzen ca. 5-1o % des gesamten Injektorvolumens nicht überschreiten (DIXMIER et al., 1967).

Bei automatischer Probenaufgabe, die hier nicht angewandt wird, müßten weitere Probleme wie z.B. Reproduzierbarkeit der Injektionsmengen behandelt werden. Bei der manuellen Probenaufgabe muß entsprechend Routine und Gewissenhaftigkeit des Bedienungspersonals diesen Fehler so klein wie möglich halten.

2.2.2. Anforderungen an die Säule

Die Gaschromatographie ist grundsätzlich ein Kompromiß zwischen den drei Kategorien Trennschärfe, Menge, Geschwindigkeit (Abb. 2), denen nicht gleichzeitig entsprochen werden kann.

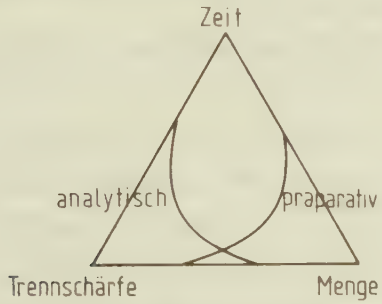


Abb. 2: Verdeutlicht die Gegensätzlichkeit der drei nicht gleichzeitig optimierbaren Anforderungen: Schnelligkeit, hohe Trennschärfe und große Präparationsmenge.

Eine hohe Trennschärfe läßt sich für die Analyse am besten mit geringen Substanzmengen und auf einer langen Säule, d.h. mit großem Zeitaufwand, erzielen. In analoger Weise widerspricht die Optimierung jeweils eines Faktors den beiden übrigen.

Gerade bei der präparativen GC ist ein Kompromiß besonders erforderlich, denn um nicht unnötig Spielraum zu verschenken, gilt es, die vielfältigen Einflüsse auf die Trennleistung einer Säule möglichst vollständig zu kennen und bewußt einzusetzen.

Eine Zusammenfassung der bekannten Einflüsse bietet ein allgemein akzeptiertes Modell, das beschrieben wird durch die

van Deetmer Gleichung: $h = A + \frac{B}{u} + C_g u + C_l u$

mit h = HETP= Height Equivalent to a Theoretical Plate

u = Gasgeschwindigkeit

A, B, C_g, C_l = Konstanten oder Koeffizienten

Hierin bedeutet h ein Maß für das Auflösungsvermögen einer Säule. Je kleiner h, welches die Einheit cm hat, desto besser ist die Trennleistung. Dieses wird im wesentlichen durch vier Faktoren, genannt A, B, C_g, C_l und durch die Gasflußgeschwindigkeit u bestimmt. Darin ist A ein Maß für die Varianzvergrößerung durch Gasverwirbelung an dem meist kugelförmigen

Trägermaterial der stationären Phase. A wächst mit dem Radius der Kügelchen und mit der Streuung der Radien.

B beschreibt den störenden Einfluß der axialen Diffusion. Besonders bei langsamen Trägergasgeschwindigkeiten kommt eine Verbreiterung der Peaks dadurch zustande, daß die Diffusion der verdampften Substanz entlang der Säule eine scharfe Trennung zwischen zwei Komponenten verwischt.

Um den Quotienten B/u gering zu halten, ist einerseits die Trägergasgeschwindigkeit u groß zu halten und andererseits die axiale Diffusion B gering zu halten. Letzteres kann erreicht werden durch hochmolekulare Trägergase, deren relativ geringere Brown`sche Molekularbewegung eine geringere Diffusion erzeugt. C_g und C_l schließlich sind Faktoren , die zusammengesetzt sind aus Diffusionskonstanten der stationären und gasförmigen Phase, der Dicke und Viskosität der stationären Flüssigkeit und aus dem Verteilungsgleichgewicht der Substanz zwischen Gas und Flüssigkeit. Der Einfluß beider Faktoren wird mit größerem u stärker, weshalb in die van Deemter Gleichung jeweils das Produkt C·u eingeht.

Aus dieser Gleichung läßt sich theoretisch schließen, was auch praktisch erwiesen ist (GIDDINGS,1965), daß die Gasgeschwindigkeit einen optimalen Wert annehmen kann. Verringert man die Geschwindigkeit, so gewinnt B zuviel Einfluß. Eine Erhöhung wirkt sich ungünstig auf die Faktoren C_g und C_l aus (Abb.3).

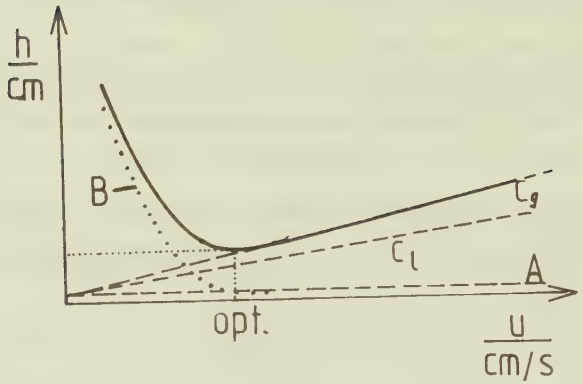


Abb.3: nach PECSAR, Raymond E, 1971, zeigt den Zusammenhang von Gasgeschwindigkeit u und Trennleistung h (durchgezogene) sowie den isolierten Einfluß der jeweiligen Faktoren B, A, Cg und C_l auf h (gestrichelte Linie).

Wie oben erwähnt, ist aber die Trenngüte h einer Säule nur einer von drei Faktoren, die berücksichtigt werden müssen. So fordert die van Deemter Gleichung einen möglichst geringen Radius der Trägerpartikel, der zu einer dichten Packung mit wenig Raum für das Trägergas führt. Damit wird aber bei kleinerem Trägergasvolumen das Fassungsvermögen reduziert , so daß die Säule eher überladen ist und für die Präparation größerer Mengen nicht mehr geeignet ist.

Obwohl sich die von uns vorgestellte Arbeit der präparativen GC widmet, sind doch die Voraussetzungen und Zielsetzungen bei dieser Arbeit dergestalt, daß mehr Gewicht gelegt wird auf die Trennschärfe der Säule als auf die Präparation möglichst großer Mengen.

Als Richtlinie für die Arbeit dienten deshalb die folgenden Angaben, die den Zusammenhang zwischen HETP, Gasgeschwindigkeit und Säulendurchmesser beschreiben:

Säulendurchmesser	Helium	N_2	h
inches	Fluß in ml/min		mm
1/8	3o	15	o,4
1/4	65	25	o,6
3/8	22	9o	1,o
3/4	-	15o	1,5
1/2 - 1	21oo	-	1,7

Tab. 1: (aus ZLATKIS 1971, S. 82) zeigt an exemplarischen Werten die jeweils höchste erreichte Trenngüte h für die verschiedenen Säulendurchmesser.

Wie sich h in Abhängigkeit vom Trägergasfluß ändert zeigt folgende Abbildung 4.

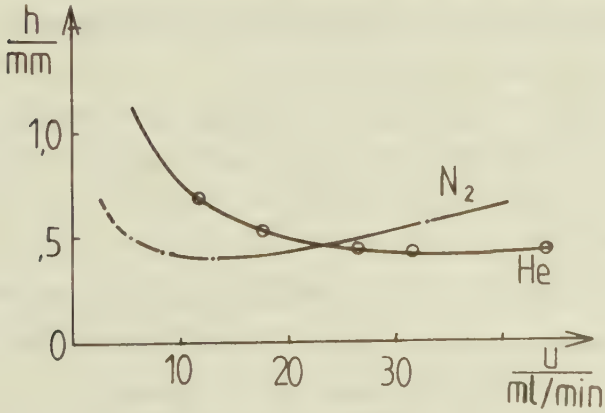


Abb. 4: (nach PECSAR, 1971) zeigt, daß für N_2 das Optimum an Trennleistung gegenüber He bei niedrigeren Gasflußgeschwindigkeiten liegt.

Hieraus geht hervor, daß sich größere Substanzmengen am besten mit Helium bei höheren Flußgeschwindigkeiten trennen lassen. Meist heben jedoch in der Praxis die erheblich höheren Kosten für Helium die gewonnenen Vorteile wieder auf.

Wie schon in der Besprechung der van Deemter-Gleichung zum Ausdruck gekommen, muß jedoch neben der Menge und Eigenart des Trägergases auch die Form des Trägermaterials berücksichtigt werden.

Einigkeit besteht darin, daß ein feinkörniges Trägermaterial am besten ist, welches,möglichst lückenlos mit einer flüssigen stationären Phase versehen, in ein wie auch immer geformtes Rohr gepackt wird.
Für großindustrielle Zwecke müßte der Querschnitt der Säule wegen Unregelmäßigkeiten im Gasfluß und Temperaturgradienten innerhalb des Trägermaterials den speziellen Anforderungen angepaßt werden (SZEPESY,197o).
Für Präparationen im Mikrogrammbereich erübrigen sich diese Überlegungen, da hier die stationäre Phase und das Trägermaterial größeren Einfluß haben.

Die Säule selbst sollte aus einem chemisch inerten, gut formbaren, stabilen Material sein; wegen des Vorrangs der ersten Eigenschaft wird hier meist Glas bevorzugt.

Als Trägermaterial käme prinzipiell jede hitzebeständige, formstabile Substanz in Frage. Praktisch eingeführt,kostengünstig und den meisten Zwecken angepaßt ist Kieselgur, angeboten unter dem Namen Chromosorb. Je nach Behandlung und Ausglühvorgang werden vor allem vier chromatographisch nutzbare Arten angeboten, das Chromosorb P,W,G und A.

Chromosorb P ist das billigste und wird für die Präparation großer Mengen bevorzugt, da es durch große Absorptionsfähigkeit eine dicke Flüssigkeitsschicht binden kann, die große Präparationsmengen erlaubt. Chromosorb W und G haben sehr viel geringere Absorptionsfläche, Chromosorb G ist besonders inert, hart und hat eine relativ geringe Oberfläche. Die genannten Eigenschaften prädestinieren letzteres für die Analyse und Präparation kleiner Mengen, da hier eine dünne flüssige Phase auf inertem Material verlangt wird.

Die Auswahl der flüssigen Phase ist weniger bestimmt von der Menge der gaschromatographierten Substanz als von deren chemisch-physikalischen Eigenschaften. Entscheidend ist also mehr die Anpassung an die zu untersuchenden Stoffe bezüglich der Polarität, der Hitzebeständigkeit und der Störungsfreiheit für den nachgeschalteten Detektor. Hier kann keine genaue Richtlinie vorgegeben werden, entscheidend ist der gewünschte Anwendungsbereich.

Ein früher häufiger auftretender Fehler bestand im soge-

nannten "Bluten" der Säule, welches durch abgelöste stationäre Phase bei zu hohen Temperaturen eine Untergrundaktivität im Detektor hervorrief. Durch einmaliges "Konditionieren", also 24-stündiges Aufheizen auf die maximale Arbeitstemperatur, läßt sich bei den heutigen hochsiedenden Flüssigphasen dieses Problem weitgehend ausräumen. Hierdurch werden die immer vorhandenen Verunreinigungen und die Anteile der nicht genügend absorbierten Flüssigphase weitestgehend ausgespült.

Die nächste Forderung, die sich wieder von der van Deemter-Gleichung ableitet, ist die Minimierung des Durchmessers der Trägerpartikel. Es gilt:

1) HETP = h ist proportional zum Partikelradius
2) Das Druckgefälle entlang der Säule ist umgekehrt proportional zum Quadrat des Partikelradius.

Dies bedeutet, daß jeder Gewinn an Trenngüte, der durch Reduktion des Partikelradius erreicht wird, erkauft werden muß durch eine erhebliche Erhöhung des Trägergasdruckes , um die notwendige Flußgeschwindigkeit aufrecht zu halten. Ein hoher Druck am Säulenanfang hat aber neben technischen Schwierigkeiten auch den Nachteil, daß zur Verdampfung im Injektor höhere Temperaturen nötig werden. Außerdem verhält sich dann das Verteilungsgleichgewicht zwischen Gas- und Flüssigphase ebenso wie die lokale Gasflußgeschwindigkeit am Säulenanfang erheblich anders als am Säulenende.

Ein anderes Argument gegen zu kleine Partikelradien ist die technische Verwirklichung kleinster Partikel ohne große Streuung der Durchmesser. Der Term A der van Deemter-Gleichung, den Golay als "Multipfad Term" bezeichnet hat, weil er den Störungen durch die Vielzahl von Teilströmen zuzuordnen ist, in die sich der Gasstrom zwischen den Partikeln teilt, hängt nicht nur von der Größe,sondern im gleichen Maße auch von der Gleichheit der Radien ab. Große Streubreiten der Radien schaden ebenso wie bloß zu große Partikel.

PECSAR (1971) empfiehlt deshalb für hocheffiziente Apparaturen als guten Kompromiß zwischen Teilchengröße, regelmäßiger Herstellbarkeit und aufzuwendendem Druck eine Partikelgröße von 12o bis 14o mesh, entsprechend einem Durchmesser von 1o2 - 125 µm.
Bei solch feinen Korngrößen kommt es ganz besonders auf die mechanische Stabilität der Partikel an, die innerhalb der Kieselgurmaterialien am besten bei Chromosorb G gegeben ist. Noch günstigere Werte liegen bei Schamottepulver vor (LEIBNITZ et al. 1967). Auf Probleme des gleichmäßigen Beschichtens soll hier nicht eingegangen werden, da hinreichend gute,fertig beschichtete Materialien geliefert werden.

Bei großen Säulen mit über 1 inch Durchmesser tritt ein weiteres Problem zutage: Die immer vorhandene Unregelmäßigkeit der Trägerpartikel führt bei dem konventionellen

Packen mit Klopfen oder Ultraschall zu ungleicher Verteilung von kleinen und größeren Partikeln.

Die unter Berücksichtigung aller obigen Punkte zusammengestellte Säule sollte den gegebenen Anforderungen voll genügen.

2.2.3. Aufbau des Auslaßsystems

Bei jeder Präparation wird angestrebt, einen möglichst hohen prozentualen Anteil der injizierten Komponentmenge in isolierter Form zurückzugewinnen. Hierzu ist es nötig, die gerade aus dem Säulenende austretende Substanz einerseits zu registrieren und andererseits aus dem Gasstrom herauszulösen, um sie in ein hierfür bereitgehaltenes Gefäß zu überführen.

Für die Detektion gibt es zwei grundsätzliche Alternativen:

1. Über einen Teiler wird ein möglichst geringer Gasstromanteil einem Detektor zugeleitet, während der größte Teil aufgefangen werden kann. So ist jeder Detektor einsetzbar, auch solche wie die Flammenionisationsdetektoren (FID), die die Substanz beim Nachweis zerstören.

2. Es werden Detektoren eingesetzt, die die Substanz nicht unbedingt zerlegen, wie etwa Wärmeleitfähigkeitsdetektoren. Neben einem Empfindlichkeitsverlust sind hier erhebliche Schwierigkeiten bei der Arbeitspunkteinstellung zu bewältigen.

Bei beiden Methoden bleibt jedoch die Überführung der austretenden Substanz in ein Sammelgefäß auf mehrere kritische Punkte hin zu untersuchen.

Zunächst muß die Leitung vom Säulenausgang zum Gefäß folgenden Anforderungen genügen:

1. Sie sollte so kurz wie möglich sein, um
   a) Laufzeitdifferenzen zwischen Nachweis im Detektor und Austritt der Substanz in das Sammelgefäß zu vermeiden, und
   b) die hier stärkere Diffusion und Verwirbelung zu umgehen.

2. Sie muß gleichmäßig temperierbar sein, ohne lokale Überhitzung oder Kaltstelle.

3. Um keine Umschaltpeaks im Detektor zu erzeugen, sollte sie möglichst ohne Unterbrechung des Gasflusses zwischen mehreren Auffanggefäßen umschaltbar sein.

4. An die chemische Stabilität sind, wenn die obigen Punkte

erfüllt sind, keine allzu großen Anforderungen zu stellen, da im laminaren Gasstrom durch ein kurzes Leitungsrohr der Kontakt zwischen Substanz und Rohrwandung minimal ist. Schon ein Aluminiumrohr erfüllt deshalb diese Forderung hinreichend. Bei gleichmäßiger Wandstärke kann ein solches Metallrohr mit elektrischer Beheizung durch einen Linienstrom von einigen Ampère den oben genannten zweiten Punkt erfüllen.

Um dem ersten Punkt zu entsprechen, ist die räumliche Anordnung zu optimieren.

Gegenstand ausführlicher Untersuchungen ist schließlich die Konstruktion eines Umschaltventils, welches den hohen Temperaturen, die hier auftreten, standhält und gleichzeitig ohne Unterbrechung des Gasstromes eine saubere Trennung in die verschiedenen Sammelgefäße ermöglicht. Da hier das Material der Ventildichtungen am anfälligsten ist, wurden Lösungen überlegt, bei denen die Ventile hinter den jeweiligen Sammelgefäßen in den kalten Bereich verlegt werden:

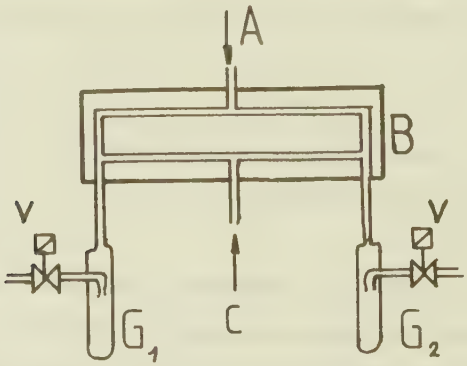


Abb. 5: (nach HUPE, 1971) zeigt skizzenhaft einen beheizbaren Block B, der den Gasstrom A in dasjenige von den beiden Sammelgefäßen leitet, hinter dem das Ventil V offen ist.

G_1, G_2 = Sammelgefäße C = Spülgaszufuhr

B = Beheizbarer Block

Bei A tritt das Trägergas mit der gelösten Substanz ein, während ein Spülglas (C) dafür sorgt, daß das Material nur den gewünschten Weg, gekennzeichnet durch Pfeile, einschlägt. Durch Öffnen eines Ventils wird nun das jeweils davor liegende Gefäß beladen.

Die Sammelgefäße oder Kühlfallen sind das letzte Glied in der Kette der Präparation. Auch dieser Teil der Rückgewinnung, die Auslösung der Substanz aus dem Trägergas, ist ein komplizierter, thermodynamischer Prozeß. Der Gasstrom muß abgekühlt werden, um den Stoff kondensieren zu lassen. Leider bildet sich hier häufig ein Nebel oder Aerosol, und die Einzeltröpfchen folgen nicht mehr dem Konzentrationsgefälle in Richtung auf die kalte Gefäßwandung, wie es die gelösten Moleküle tun.
Zwei verschiedene Ansätze führen weiter:
Entweder wird die Nebelbildung akzeptiert und nach Möglichkeiten gesucht, die entstandenen Nebeltropfen zum Niederschlag zu bringen, oder die Nebelbildung wird direkt vermieden.
Hierzu folgende Skizze:

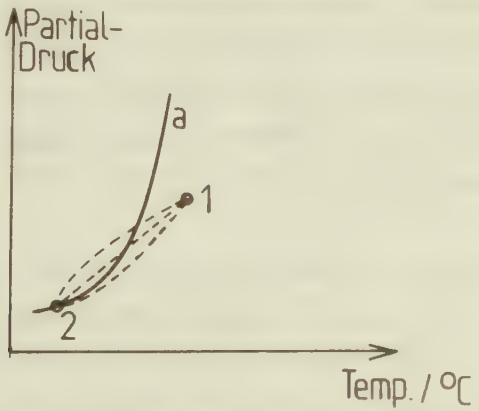


Abb. 6: zeigt als gestrichelte Linien drei mögliche Abkühlungskurven, von denen nur die unterste die Sättigungsgrenze a nicht schneidet und damit ohne Nebelbildung abläuft.

Die durchgezogene Linie stellt die Verbindung aller Punkte dar, an denen gerade die Sättigung des Gases erreicht ist. Links und oberhalb davon ist Übersättigung erreicht, die bei Vorhandensein von Kondensationskeimen sofort zur Nebelbildung führt. Rechts davon ist das Gas wärmer als nötig, um die Substanz völlig gelöst zu halten.
Eine langsame Abkühlung entlang Kurve a oder darunter kann nicht zur Nebelbildung führen, da sie die Sättigungsgrenze nie überschreitet. Die Moleküle haben Zeit, dem Konzentrationsgefälle entlang des Temperaturgefälles zu folgen, und erst an der Wand zu kondensieren.
Dieser Prozeß kann durch die Anwesenheit eines Absorbens beschleunigt werden, welches den wirksamen Partialdruck der Substanz reduziert, und so die Abkühlungslinie $\overline{12}$ nach unten verschiebt.

Prinzipiell anders gehen solche Konstruktionen vor, die sich bemühen, die entstandenen Nebeltröpfchen einzufangen. Man läßt die Sammelgefäße in einer Zentrifuge rotieren, was zum Niederschlag des gebildeten Nebels führt. Überdies hat es den Vorteil, daß die Substanz auf sehr kleinem Raum gesammelt wird.

Eine weitere Möglichkeit, den Nebel zum Niederschlag zu bringen, besteht in der Anwendung eines elektrostatischen Feldes, welches ebenfalls die meist elektrisch geladenen, kleinsten Tröpfchen in die gewünschte Richtung lenkt.

Für die praktischen Erfordernisse bleibt also innerhalb der beschriebenen Möglichkeiten die geeignete Methode unter Beachtung aller genannten Einschränkungen auszusuchen.

3. Material und Methodik

3.1. Material

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche sind , sofern nicht ausdrücklich anders angegeben, auf der im folgenden beschriebenen Gerätekonfiguration durchgeführt worden.

Gaschromatograph:	Modell F 2o FE Fraktiometer von Perkin Elmer mit zugehörigem Temperaturprogrammregler
Verstärker:	FID-Amplifier von Perkin Elmer
Gasflußregler und Perlenspannungsgeber:	Perkin Elmer PND-Supply
Heizstromgerät:	Power Supply GPS2 von RIC
Schreiber:	Einkanalröhrengerät von Hitachi 1969
Ableitungsrohr:	GC-L von Beckman-RIC Limited
Schlauchkupplungen:	Teflonschlauch für HPLC und Silikonschlauch von RIC

Säulen:	a) Glassäule 1/16 , 1o8 cm lang
	b) Glassäule 1/16 , 2o2 cm lang
	c) Metallsäule 1/16 , 1o8 cm lang
Füllung:	Chromosorb G, 8o/1oo mesh, beschichtet mit OV 17 2,5 % von Perkin Elmer
Sammelgefäße:	"Microcaps" 2o µl und 1oo µl von Drummond Scient. Co.
UV-Spektroskop:	von Perkin Elmer, Modell 4o2, mit Halbmicroküvetten
Massen-Spektrometer:	CH 7 A mit Varian Mat, mit Spectro System SS 1oo. Vorgeschaltet wurde der für Kapillarsäulen umgerüstete Varian GC 17oo mit 15 m langer Kapillarsäule und OV 1 - Füllung.

3.2. Liste der Änderungen

Der zum Fraktiometer F 2o FE mitgelieferte Injektoreinsatz in Form einer passenden Metallröhre wurde ersetzt. Ein von Perkin Elmer gelieferter Einsatz, in dessen Röhre eine Glashülse eingepaßt ist, verringert die Gefahr der Katylse an heißen Metalloberflächen.

Als Detektor wurde der oben bezeichnete Stickstoff-Flammenionisationsdetektor eingesetzt.

Zwischen Detektoreingang und Säulenausgang wurde ein einfacher Casstromteiler von Perkin Elmer eingesetzt. Laut

Herstellerangabe sind die Gas-Widerstandsstrecken so bemessen, daß 1/1o des Gasstroms zum Detektor und 9/1o zum Ausgang geleitet werden.

Über angelötete Swagelockverbindungen wurde das beheizbare Ableitungsrohr an den 9/1o-Ausgang des Teilers angesetzt. Um diese Ansatzstelle, die sich durch Strom nicht gleichmäßig hatte beheizen lassen, warm zu halten, wurde sie in den Ofenraum gelegt. Durch einen Linienstrom wird nur die Strecke beheizt, die in der Asbestwandung und außerhalb des Chromatographen liegt.

Von dem "Ableitungsrohr" der Firma RIC wurde ein Führungsstab als mechanische Halterung und ein am Ende angesetzter Metallblock abgetrennt, da diese Teile sich nicht gleichmäßig beheizen ließen.

Stattdessen wird als Kupplung zwischen dem beheizten Rohr und einem Auffanggerät ein Teflonschlauchstück verwendet, dessen konisch aufgeweitete Öffnung die Sammelkapillare aufnimmt (siehe Kap. 4.7).

Der Heizstrom wird im Ofen über einen angelöteten Kupferdraht zugeführt, der zweite, außerhalb liegende Anschluß konnte nicht gelötet werden, da hier durch allzu gute Wärmeleitfähigkeit und geringen elektrischen Widerstand der Lötverbindung eine Kaltstelle entstanden wäre.
Die besten Ergebnisse wurden hier mit einer einfachen Klemmverbindung erzielt.

3.3 Methodik

3.3.1 Voreinstellungen

3.3.1.1 Gasdruck

Um einen reproduzierbaren Detektorausschlag zu erhalten, ist es nötig, die durch Gasflußregler konstant gehaltenen Flußmengen immer gleich einzustellen.
Die größte Nachweisempfindlichkeit des NFID ergab sich bei einem Druck von 1,9 bar für das O_2/N_2-Gemisch und 1,8 bar für H_2, entsprechend einem Fluß von 5o ml/min bzw. 1,8 ml/min.

Dennoch wurde der H_2-Druck auf 2,0 bar erhöht, um eine hinreichend kurze Detektorreaktion auf die eingesetzten Methanolmengen zwischen einem und fünf Microlitern zu erzielen. Eine geringe Reduktion der Empfindlichkeit wird dabei in Kauf genommen.
Das Trägergas N_2 wurde mit 3 bar eingestellt, entsprechend einem Fluß von ca. 5o ml/min bei 18o ° C. Bei höheren Temperaturen verringert sich der Fluß bis auf 2o ml/min bei 25o ° C.

3.3.1.2 Perlenspannung

Die Perlenspannung mußte im Lauf der Versuche mehrfach nachgeregelt werden. Zuletzt ergab sich für einen gewünschten Nullstrom von 3o Skalenteilen = 3 mV am Eingangswiderstand des Schreibers eine Perlenheizspannung von 6oo mV.

3.3.1.3 Temperaturen

Detektor und Injektor wurden auf 27o °C eingestellt, sofern nicht anders vermerkt. Die Temperatur des Ofenraums war routinemäßig zu Beginn auf 18o °C eingestellt und wurde direkt nach der Injektion mit 2o °C/min auf 25o °C aufgeheizt.

3.3.1.4 Ausführungsrohr

Das nachträglich eingebaute Ableitrohr liegt zu zwei Dritteln seiner Länge im Ofenraum, während das äußere Drittel mit einem Linienstrom nach Herstellerangaben beheizt wurde, routinemäßig mit 6 Ampère.

Tab.2: Strom-Temperatur-Korrelation nach RIC-Angaben:

4 A =	13o °C
5 A =	18o °C
6 A =	23o °C
7 A =	29o °C

3.3.2 Säulenfüllung

Die benutzten Säulen wurden selbst gefüllt. Nach gründlicher Reinigung mit Alkohol und Wasser wurde die Glassäule mit Dichlor-dimethyl-silan imprägniert und anderentags mit Xylol ausgewaschen. Eine Methanol-Umsetzung entfiel.
Mit dem Sog einer Wasserstrahlpumpe und unter Beschallung im Ultraschallbad wurde das beschichtete Trägermaterial langsam eingefüllt und die Enden mit silanisierter Glaswolle abgedichtet. Mit bloßem Auge ließen sich so keinerlei Unregelmäßigkeiten der Füllung sehen.
Konditioniert wurde die Säule bei 25o °C und 15 ml/min N_2 für die Dauer von 24 Stunden.

3.3.3 Injektionstechnik

Zu Beginn einer Probenreihe wurde ein Gemisch aus 5oo µl der o,1 %igen Probesubstanz mit 5o µl der 1 %igen Referenzsubstanz hergestellt. So war die Konzentration von Probe und Referenz jeweils gleich und betrug o,91 µg/µl.

Vor der Injektion einer neuen Probe wurde zur Kontrolle eine Leerprobe eingegeben, um eventuelle Reste im Injektor zu eliminieren. Die Spritze wurde überdies je nach Notwendigkeit in die Einzelteile zerlegt und mit Wasser und Methanol im Wechsel gewaschen.

Um bei der Injektion eine Verdünnung mit Restlösungsmittel aus der Spritzennadel zu vermeiden, wurde die folgende Injektionstechnik verwendet:

Zunächst Aufsaugen von Luft bis zur 1 µl-Marke, der Stempel zieht dabei etwa o,7 µl Methanol aus der Nadel in den geeichten Glaszylinder der Spritze. Dann Aufziehen der gewünschten Substanzmenge und zum Schluß noch ca. 1 µl Luft. Es folgt die übliche, zügige Injektion der Substanz.

3.3.4 Präparation

3.3.4.1 Rückgewinnung

Die Rückgewinnung der eingegebenen Probe sollte erst dreißig Sekunden nach dem Lösungsmittelpeak beginnen, um die Verstopfung der dünnen Kapillare durch kondensierendes und gefrierendes Methanol zu umgehen. Durch Variation der Ofentemperatur läßt sich dieser zeitliche Abstand gegebenenfalls erreichen.
Unmittelbar vor dem zu isolierenden Peak wird die Sammelkapillare in die Schlauchkupplung eingesetzt und in flüssigem N_2 gekühlt.

Nach dem Ende des Peaks auf dem Schreiber wird in der Regel wieder etwa 3o sek weiter gesammelt, da die Substanz nicht genau synchron austritt, sondern mit geringer Verzögerung erscheint.
Das weitere Verfahren ist nun von der Verwendung der Probe abhängig.

3.3.4.2 UV-Messung

Für die UV-Messung wird die Substanz in der unverschlossenen Kapillare zum UV-Spektrographen gebracht und dort mit 5oo µl 5o %igen Methanols in die Meßküvetten gespült. Zur etwa nötigen Einstellung des pH-Wertes dienten je 2o µl einer o.15-normalen H_2SO_4 - beziehungsweise einer o.3-normalen NaOH-Lösung.

3.3.4.3 Vorbereitung zur Massenspektrometrie

Für die Überführung zur Massenspektrometrie wird die Sammelkapillare mit ca. 1 µl Methanol beschickt und durch mehrmaliges Kippen der "Microcaps" die kondensierten Partikel der Substanz gelöst.
Anschließend werden beide Enden im Abstand von 1o Sekunden nacheinander zugeschmolzen, um die Entstehung von Unterdruck in der geschlossenen Kapillare durch die langsam abkühlende Luft zu umgehen. Anderenfalls wird beim späteren Öffnen der Kapillare die Methanolsäule durch schlagartig ein-

strömende Luft in kleinste Tröpfchen zerstäubt, die sich mit der Spritze nicht mehr aufziehen lassen.

Bei Beachtung dieses Punktes ist das Öffnen der Kapillare problemlos: Beide Enden werden abgebrochen und mit der dünnen Nadel der Injektionsspritze kann nun der Inhalt aufgesogen werden. Falls die Lösungsmittelmenge zu groß für die Kapillarsäule ist, kann durch einfaches wiederholtes Kippen des "Caps" bei offenen Enden das Volumen des Methanols reduziert werden.

4. Praktische Vorversuche

4.1 Einstellung des NFID

Der ursprüngliche Gaschromatograph, im weiteren nur noch als "GC" bezeichnet, mußte nach Einbau des Gasteilers und des Ableitungsrohres von Grund auf neu eingestellt werden.
Der Detektor wird nur noch von ca. 1o % der üblichen Trägergasmenge durchspült, und der Gasteiler selbst stellt einen erheblichen Gaswiderstand dar, so daß weder Gasdrucke noch Flußmengen vom Normalbetrieb übernommen werden können.
Nach der Modifikation ergibt sich die folgende Korrelation:

Tab.3: Auf der vorgestellten Apparatur erreichte Flußgeschwindigkeiten bei verschiedenen H_2- und O_2-Drucken

H_2		O_2	
Druck in at	Fluß in ml/min	Druck in bar	Fluß in ml/min
1,o	1	o,5	1o
1,5	2	1,o	21
2,o	3,2	1,5	36
2,5	4,8	2,o	55

Diese Werte sind mit einem Blasensteigrohr ermittelt worden, welches unmittelbar an die freigelegte Düsenöffnung des Detektors angeschlossen worden ist, um so auch bei kleinen Werten exakt zu messen. Nach der Anweisung zur Ersteinstellung von Perkin-Elmer für den PN-Betrieb wird die Einstellung der Gase vorgenommen bei einem mittleren N_2-Fluß von 3o ml/min. Ziel ist es, den H_2-Fluß soweit wie möglich zu reduzieren, ohne daß Unregelmäßigkeiten des Nullstroms oder gar eine Löschung der Pharmakugelschicht auftreten.

Auf der gegebenen Apparatur wird das Minimum mit einem Fluß von 1,8 ml/min erreicht, was bei einer Perlenspannung von 57o mV und einer Ofentemperatur von 18o ° C einen stabilen Nullstrom erbrachte.

4.2 Ermittlung der Nachweisgrenze

Der folgende Versuch weist nach, daß mit der obigen Ein-

stellung auch die um den Faktor 1o reduzierte Empfindlichkeit hinter dem Gasteiler voll ausreicht:

Nach wiederholter Injektion von reinem Methanol wurde je 1 µl einer 2 x $1o^{-3}$ g/l Lösung Coffein und Antipyrin eingespritzt. Durch die Methanolinjektion, bei der kein Peak im Untergrundrauschen erscheint, wird die "Rauschbreite" bestimmt als das Intervall, in dem jeder registrierte Detektorstromwert liegt. Als Nachweisgrenze kann dann die dreifache halbe Rauschbreite bezeichnet werden, da ein Peak, der über dieser Grenze liegt, mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,73 % nicht durch eine zufällige Rauschzacke entstanden ist. Siehe Abbildung 7.

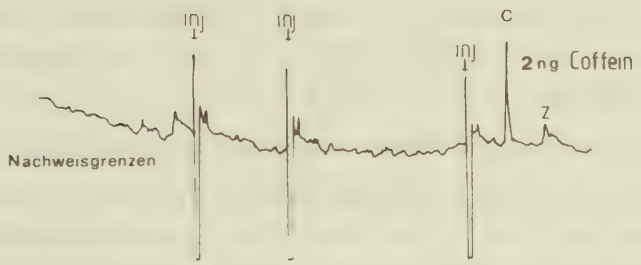


Abb. 7: Original Chromatogramm zur Bestimmung der Nachweisgrenzen mit Coffein. Nach zwei Injektionen von reinem Methanol folgt die Injektion von 2 ng Coffein.
C = Coffeinpeak

Auf die bezeichneten zusätzlichen Peaks (Z) wird in Kap.4.6 eingegangen.

Im vorliegenden Versuch ergab sich die Nachweisgrenze zu

etwa o,5 ng Coffein bzw. zu o,3 ng Antipyrin. Da die zu präparierenden Mengen im Bereich von 5oo ng bis zu 5 µg liegen, ist die Detektion gesichert.

4.3 Heizstrom und Ableitrohr

Wie im Kapitel 3.2 erwähnt, wurde das beheizbare Ableitungsrohr von RIC zunächst nach Produktbeschreibung angeschlossen. Die ersten Präparationsversuche mit Coffein ergaben jedoch Auffangraten unter 1o % bei einer Beheizung mit 6 Ampère . Bei höherem Strom besserte sich die Quote.

Da die elektrische Wärmeerzeugung auf einer Strecke des Rohres vom Widerstand an dieser Strecke gemäß der Gleichung:

$$P_{Wärme} = U \times I = I^2 \times R_{Strecke}$$

abhängt, muß gelten, daß dieser Widerstand entlang des Ableitrohres möglichst gleichmäßig verteilt ist, um keine lokale Überhitzung an Stellen zu hohen elektrischen Widerstands und vice versa Abkühlung an anderen Stellen zu erzeugen.

Kaltstellen:
Weil im beschriebenen Versuch höhere Ströme als erwartet nötig wurden, bestand der Verdacht, daß eine lokale Kalt-

stelle existierte, die erst bei Überhitzung des Restrohres warm genug wurde. Die Kaltstelle wurde identifiziert als eine zu große, massive Aluminiumplatte am Auslaßteil des Rohes von RIC.
Nach Abtrennung dieses Endes ließ sich Coffein zu über 7o % wiedergewinnen.
Bei dieser Auffangrate und bei der Präparation von nur wenigen Microgramm Coffein läßt sich auch optisch die Präparation verfolgen, da sich im Abstand von etwa einem halben Zentimeter vom Ende des Rohres in der Sammelkapillare ein Kondensationsring von Coffein bildet.

Überhitzung:
Der umgekehrte Fall einer Heißstelle zeigte sich erst nach mehreren Präparationen am Beispiel des im weiteren als Referenzsubstanz verwendeten hydrolysierten Bromazepams.
Auch diese Substanz läßt sich optisch als gelber Niederschlag in der Sammelkapillare sehr gut identifizieren. Durch zu große Hitze wird die Substanz jedoch zersetzt und verliert die gelbe Farbe.
Das Verschwinden der gelben Farbe ist ein deutlicher Hinweis für eine thermische Zersetzung, die bei der beschriebenen Apparatur periodisch dann auftrat, wenn die beschriebene Klemmverbindung aus Kupferdraht nach tagelangem Gebrauch bei Strömen über 6 Ampère oxidiert war.
Der Ersatz in Form einer passend gebogenen Büroklammer ist problemlos.

4.4 Zeitliche Verzögerung im Ableitrohr

Da der Weg hinter dem Splitter zum Detektor erheblich kürzer ist als die Länge des Ableitrohres, mußte ausgeschlossen werden, daß eine Zeitverzögerung zwischen dem Schreiberausschlag und dem tatsächlichen Austritt der Substanz störend bemerkbar wird.

Zur Bestimmung der Verschiebung wurden 5o µg Coffein, also eine Menge, mit der die Säule sicher überladen ist, injiziert. Das Ergebnis zeigt sich in Form eines zwar deformierten, jedoch hinreichend scharfen Peaks auf dem Schreiber. Die 4o-Sekunden Fraktionen waren noch ausreichend groß, um eine grobe optische Mengenkontrolle zu erlauben.
Eine einfache Einteilung in drei willkürliche Mengeneinheiten ist ausreichend, um das Ergebnis im Schaubild zu demonstrieren:

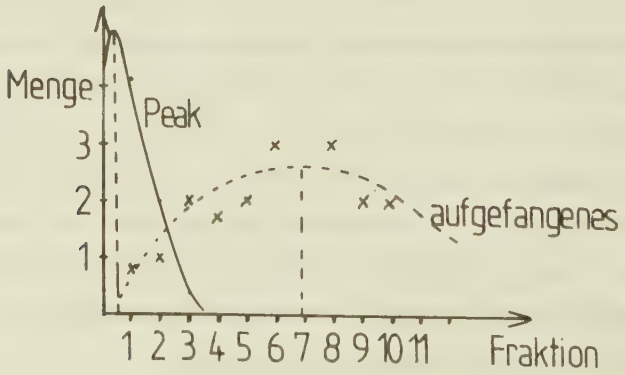


Abb. 8: Zeitlicher Verlauf des Detektorpeaks im Vergleich zu den präparierten Fraktionen des Coffeins("aufgefangenes") bei Vorliegen einer Kaltstelle im Ableitrohr.

Die Verschiebung der Mittelwerte der beiden Verteilungskurven betrug bei diesem Versuch etwa 4 Minuten, was für praktische Anwendungen nicht akzeptabel ist. Ein weiterer Fehler ist erkennbar, und zwar die erhebliche Verbreiterung des im Detektor noch relativ scharfen Peaks.

Dieser Versuch, der mit der ersten Arbeitskonfiguration mit dem ungekürzten RIC-Ableitungsrohr entstand, läßt sich am ehesten durch die vermutete Kaltstelle erklären, die durch verzögerte Freigabe von dort kondensierter Substanz eine solche Verbreiterung des Peaks zur Folge hatte.

Nach der Umänderung des Ableitrohres war sowohl die Verschiebung der Mittelwerte als auch die Verbreiterung der Peaks weitgehend behoben. Die optische Kontrolle ergab eine bis auf wenige Sekunden genaue Synchronisation. Eine genaue Dokumentation durch quantitative UV-Spektroskopie scheiterte zu diesem Zeitpunkt an den im folgenden beschriebenen Unzulänglichkeiten der übrigen Komponenten des Systems, die erst beseitigt werden mußten.

4.5 Eichung der UV-Spektroskopie

4.5.1 Meßverfahren

Nach dem Lambert-Beer Gesetz ist die Extinktion einer gelösten Substanz bei fester Durchleuchtungsstrecke propor-

tional zur Konzentration. Um die Masse der gemessenen Substanz zu bestimmen, kann entweder das Produkt aus Meßvolumen und Konzentration errechnet werden, oder es kann zu jeder einzelnen Messung durch Zugabe einer definierten Menge der gleichen Substanz direkt die Extinktion pro Microgramm bestimmt werden.

Das letztere Verfahren wurde bei unseren Versuchen angewandt, um Meßfehler und Streuungen durch die zusätzliche Volumenbestimmung zu umgehen. Im unten gezeigten Meßprotokoll beträgt die Extinktion o,16 pro Microgramm.

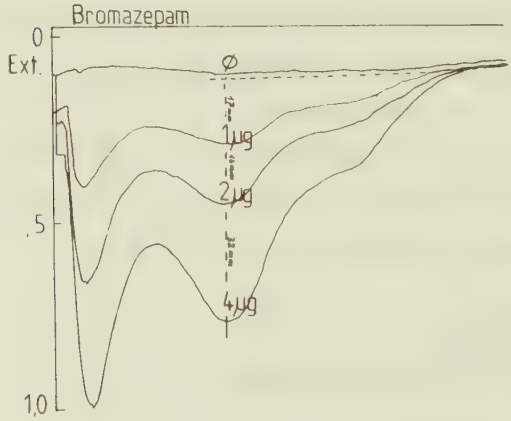


Abb. 9: Extinktionskurven für steigende Bromazepamkonzentrationen mit dem Extinktionsmaximum bei 236 nm und einer Extinktion von o,16 pro Microgramm bei dieser Wellenlänge.

4.5.2 pH-Einstellung

Manche Stoffe ergeben nur im sauren bzw. nur im basischen Bereich eine meßbare Extinktion. Vor jeder Messung wurde deshalb durch Zugabe von je 2o µl einer wässrigen Lösung von o,15 n Schwefelsäure zunächst eine pH-Senkung auf etwa 2 erreicht. Anschließend wurde durch Zugabe von 2o µl einer o,3 n Natronlauge der pH auf 12 angehoben.

4.5.3 Fehlermöglichkeiten

Die Verwendung von wässrigen Lösungen zur pH-Einstellung schließt aber die Messung der präparierten Substanzen in reinem Methanol aus, da im Bereich bis 22o nm die Extinktion durch Wasser und ausfallendes Natriumsulfat beeinträchtigt würde.
Alle Messungen wurden deshalb in einem Medium von 5o % Uvasol-Methanol und 5o % Wasser für HPLC von der Firma Baker durchgeführt.
Eine andere Fehlerquelle äußerte sich im Auftreten einer unspezifischen Extinktion von o,1 im gesamten Bereich von 21o nm bis etwa 3oo nm, die sich durch Umrühren verstärken ließ.
Da bei Verwendung einer beidseitig zugeschmolzenen Glasröhre als Rührer dieser Fehler beseitigt war, liegt die Erklärung nahe, daß die handelsüblichen Kunststoffrührer

für Halbmicroküvetten durch das Lösungsmittel angegriffen werden.

4.6 Injektoroptimierung

Den im theoretischen Teil erwähnten Anforderungen an den idealen Verdampfungsraum kommt der im GC F 2o FE vorgesehene nicht nach (siehe Abbildung 1o).

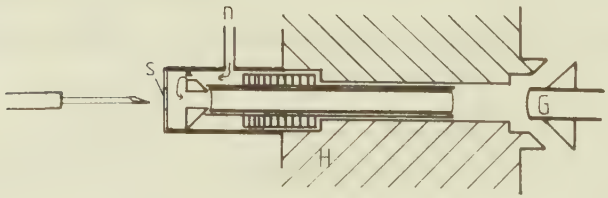


Abb. 1o: Schnittzeichnung durch den Injektorblock des GC F 2o FE mit folgenden Einzelteilen:

s = Septum des Injektors

n = Trägergaszufuhr N_2

H = Heizblock

G = Glassäule mit Dichtung.

4.6.1 Kaltstellen

Das kalte Stickstoffgas mündet an einer unbeheizten Stelle des Injektors, fließt ca. 1 cm zum Septum hin, um dann durch das Innere des Metalleinsatzrohres zur Säule hin zu strömen (siehe Pfeile). Erst dabei wird es erhitzt und verursacht so einen Temperaturgradienten vom Septum bis zum Säulenanfang. An den vorderen, kalten Stellen kann sich ein unerwünschter Niederschlag bilden. So ließ sich etwa bei der Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit (siehe Kap.4.2) nach der Injektion von Antipyrin noch ein Coffeinrest nachweisen, obwohl einige Spülinjektionen mit reinem Methanol dazwischen lagen.

4.6.2 Katalyse

Da außerdem die Wandung aus Metall besteht, wird wegen Katalysegefahr ein Injektoreinsatz mit größerer Bohrung und einer eingepaßten Glaskapillare verwendet. Der Glaseinsatz läßt sich überdies bei Bedarf gut reinigen.

4.6.3 Injektionsnadel

Durch Verwendung einer überlangen Injektionsnadel (7cm) wird überdies sichergestellt, daß die Substanz in den heißen Teil der Injektorkammer appliziert wird.

Dennoch läßt sich nach Präparation größerer Mengen häufig ein Restpeak im nächsten Chromatogramm nachweisen. Dies weist auf konstruktive Mängel des Injektors hin, da Kaltstellen an anderen Stellen zwar auch Störungen verursachen könnten, nicht aber einen Restpeak zur genau gleichen Retentionszeit.

4.7 Sammelgefäße und Kühlung

Ausgangszustand war die vorschriftsmäßige Verwendung des RIC-Ableitrohres mit kleinen "Vial"-Gefäßen. Die Ergebnisse waren unter anderem wegen der oben beschriebenen Beheizungsprobleme schlecht. Nach Kürzung des Ableitrohres wurden als Sammelgefäße "Microcaps" unterschiedlichen Volumens verwendet, die über eine einfache Schlauchkupplung in gerader Achse an die Öffnung des Ableitrohres gesetzt wurden.

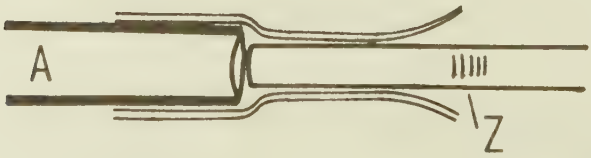


Abb. 11: Eine einfache Silikonschlauchkupplung, die auf das Ableitrohr aufgeschoben wurde, verhinderte am besten die lokale Abkühlung vor der Kapillare.

A = Ableitrohr

Z = Zone des Niederschlags

Diese Kapillare wurde zur Hälfte ihrer Länge in einer Kühlflüssigkeit gekühlt.

Kühlmittel:

Obwohl für die anfänglich verwandte Kühlmischung aus $CaCl_2$ in 5o %igem Äthanol bei der Präparation von Coffein oder Bromazepam kein signifikanter Unterschied zur N_2-Kühlung nachweisbar war, wurden die Präparationen entsprechend den Empfehlungen von KLIMES et al. (1977) mit flüssigem Stickstoff durchgeführt.

Sammelgefäße:

Einen erkennbaren Einfluß auf die Wiedergewinnungsrate hatte hingegen die Größe der Sammelkapillare. Bei der Präparation von Coffein wurde im direkten Vergleich eine 2o µl und eine 1oo µl-fassende Kapillare angeschlossen. Hier ergab sich zwischen der gekühlten und der ungekühlten 1oo µl-Kapillare kein reproduzierbarer Unterschied. Die gekühlte 2o µl-Kapillare aber erzielte beträchtlich bessere Resultate.

Bei den im weiteren beschriebenen Präparationen wurde deshalb ausschließlich die Stickstoff gekühlte 2o µl-Kapillare verwendet.

5. Praktische Ergebnisse mit der Routinemethode

5.1 Bromazepam

Da das hydrolysierte Bromazepam durch die kräftig gelbe Farbe bei der Präparation eine einfache optische Kontrolle ermöglicht und gleichzeitig recht empfindlich auf Überhitzung reagiert, diente es als mitgeführter Standard.

Absolute Retentionszeit : = 11.o min
Relative Retentionszeit : 1.o
Extinktionsmaxima im
UV-Bereich : 236 nm, 269 nm (Eigenmess.).

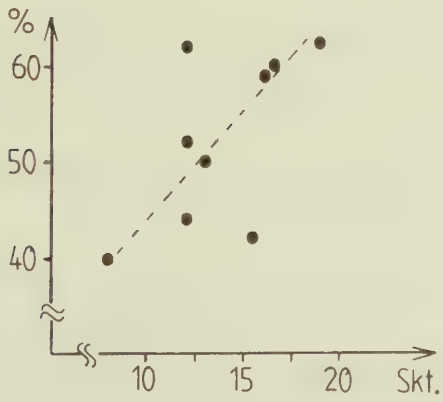
Versuche:

Die bei gleicher Injektionsmenge erzielten Peakhöhen im GC zeigen eine deutliche Streuung. Tabelle 4 zeigt bei Elimination der beiden Extremwerte eine mittlere Peakhöhe von 13.9 Skalenteilen/1oo.
Das darunter stehende Schaubild Abb.12 zeigt den Zusammenhang von Detektorausschlag und tatsächlich aufgefangener Substanz, wie sie mit UV-Messung bestimmt wurde. Hier zeigt sich erwartungsgemäß ein zufälliger Fehler durch die Präparation selbst und die nachfolgende UV-Messung.

Tab.4: Präparation von Bromazepam

Nr.	Peakhöhe in Skt/1oo	Auffangrate in %
1	15.4	42
2	8.5	4o
3	13.1	5o
4	16.o	58
5	12.1	44
6	11.7	62
7	12.1	52
8	18.9	62
9	16.6	6o
Mittel	13.9	52

Abb.12 : Schaubild der obigen Werte



Die ermittelten Werte zeigen eine vergleichsweise hohe Streuung, da bei dem vorgestellten Versuch eine Menge von 4o Microgramm präpariert wurde, um die Grenzen der Säulenkapazität zu bestimmen.

Bei der Präparation von nur 3.6 Microgramm Bromazepam, wie es als Standard bei jedem Versuch mitlief, treten deutlich geringere Schwankungen auf:

Tab. 5: Streuung des mitgeführten Standards Bromazepam bei der Präparation von Lidocain

Nr.	Peakhöhe in Skt./16o		UV-Messung des
	Lidocain	Bromazepam	Bromazepams
1	71	42	6o
2	63	41	6o
3	7o	4o	49
4	71	42	66
5	7o	36	6o
$\bar{x}$ =	69	4o $\pm$ 2,5	59

Bei der mittleren Peakhöhe von 4o x 16o Skt. betrug die Standardabweichung des Einzelwertes s = 2.5.

Bei einer anderen Serie von acht Injektionen mit je 5 Microgramm Bromazepam schlug der Schreiber des GC im Mittel um 83.5 Skt. aus mit einer Standardabweichung von s = 6.4.

Diese Toleranzen entsprechen der zu erwartenden Schwankungsbreite bei einer nicht industriell gefertigen, selbstgepackten Säule und mit dem oben beschriebenen Injektorteil des GC.
Die mittlere Wiedergewinnungsrate beträgt 62 %.

5.2. Coffein

Das gut GC-gängige Coffein mit einer mittleren Retentionszeit diente als zweite Referenzsubstanz in den Fällen, wo Bromazepam die Probesubstanz überdeckt hätte oder umgekehrt zu spät gekommen wäre.
Außerdem war Coffein als Testsubstanz bei den oben beschriebenen Vorversuchen benutzt worden.

GC: Präparation unter Standardbedingungen
Absolute Retentionszeit: = 5.o min bei 18o °C
= 4.4 min im Std.-prog.

UV: Extinktionsmaximum: 273 nm in 5o % Methanol

Bei Präparation von 3.6 Micorgramm ergab sich durchschnittlich eine Wiedergewinnungsrate von 67 %.
Bei Injektion von nur o.5 Microgramm, wie es als Probe zum Massenspektrometer geschickt wurde, ergab sich eine Rate von 7o %.

Ein Beispiel zeigt die folgende Aufstellung.

Coffein	Nr.	Skt	Rate in %
mit Diazepam	1	67,5	7o
"	2	7o	7o
mit Ephedrin	3	68	72
	4	58	52
	5	69	72

Aufstellung typischer Wiedergewinnungsraten des Bromazepams am Beispiel zweier Testsubstanzen (Diazepam und Ephedrin)

5.3. Amitriptylin

Präparation von 4 Microlitern der Reinsubstanz in o.1 % methanolischer Lösung. Dieses trizyclische Antidepressivum ist gut löslich in Wasser und Methanol.

GC: Präparation unter Std.-bed., jedoch nur mit einer Temperatursteigung von 1o °C/min
Rel.Ret.-zeit zu Bromazepam: o.75
Abs.Ret.-zeit : 1o.1 min.

UV: Extinktionsmaximum in neutraler Lösung: 24o nm
Wiedergewinnungsrate : 4o %
Rate des Bromazepams : 5o %.

Kap.-GC : Die gaschromatische Analyse mit einer Kapillarsäule und FID-Detektor zeigt, daß das Präparat aus drei voneinander getrennten Peaks besteht, von denen der größte der Reinsubstanz zugeordnet werden kann.

Schon bei der Präparation war vor dem Amitriptylinpeak ein kleiner Peak mit starkem Tailing aufgetreten, der möglicherweise durch die Zersetzung des Hydrochlorides im Injektor zustandekam.

5.4. Amphetamin

Präparation von 4 Microlitern einer o.1 % methanolischen Lösung. Das zentrale Stimulans Amphetamin ist frei löslich in Methanol. Siedepunkt ca. 2oo °C.

GC : Besondere Präparationsbedingungen:
Temp.-programm von 15o °C und mit 1o °C/min
Reduzierter N_2-Fluß von 24 ml/min
Detektor und Injektor je 22o °C
Rel.Ret.-zeit zu Coffein: o.o7
Abs.Ret.-zeit : o.8 min.

UV : Extinktion in Wasser oder Methanol zu schwach
Wiedergewinnung des Coffeins: 44 %

GC : Abschätzung der Wiedergewinnung durch Reinjektion bei gleicher Empfindlichkeit: 1o - 3o %

Kap.GC: Eine Zersetzung des Amphetamins konnte ausgeschlossen werden.

Die Präparation war erschwert durch die extrem kurze Retentionszeit, da der nötige zeitliche Abstand zum Lösungsmittelpeak gewahrt werden mußte. Andererseits tritt bei tieferen Temperaturen verstärktes Tailing auf, so daß ein Kompromiß gefunden werden mußte. So war die Wiedergewinnungsrate nicht reproduzierbar zu verbessern.

5.5 Antipyrin

Präparation von 4 Microlitern der Reinsubstanz in o.1 % methanolischer Lösung. Diese häufig als Analgeticum und Antipyreticum eingesetzte Substanz wurde stellvertretend für die Phenylpyrazolone untersucht.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen
Rel.Ret.-zeit zu Bromazepam : o.49
Abs.Ret.-zeit : 5.4 min

UV : Extinktionsmaxima in 5o % Methanol: 259 nm, 265 nm
Auffangrate : 64 %
dabei Bromazepam: 59 %

Kap.-GC : Mit dem FID wurde ein kleiner Begleitpeak festgestellt, der andeutungsweise schon in der Originallösung vorhanden war.
Wahrscheinlich handelt es sich dabei um ein Zersetzungsprodukt.

5.6 Atropin

Präparation von 4 Microlitern der Reinsubstanz als Atropinsulfat in o,1 % methanolischer Lösung. Dieses ist im Gegensatz zum Atropin gut löslich in Wasser.

GC : Präparation unter Std.-bed.
Rel.Ret.-zeit zu Coffein : 1.64
Abs.Ret.-zeit : 7.6 min
UV : Extinktionsmaxima: 252 nm, 259 nm, 262 nm
Wiedergewinnung : Ø

Der Versuch des gaschromatographischen Nachweises scheiterte. Es konnte kein Peak gefunden werden, der im Chromatogramm der Re-Injektion dem Atropin sicher zugeordnet werden konnte. Schon bei der Präparation fiel der Atropinpeak sehr klein aus, er hatte etwa 15 % der Höhe des Coffeinpeaks.
Auch im Massensummenspektrum konnte kein Atropin gefunden werden.

5.7 Chlorpromazin

Präparation von 4 Microlitern einer o.1 % methanolischen Lösung. Das Hydrochlorid ist als Neuroleptikum bekannt.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen
Rel.Ret.-zeit zu Coffein : 3.o
Abs.Ret.-zeit : 12.4 min
Breitbasiger Peak, der insgesamt 1o % der Höhe des Coffeins nicht übersteigt.

UV : Extinktionsmaxima in o.1 n H_2SO_4 : 255 nm, 3o7 nm
Wiedergewinnungsrate: 25 %
dabei Coffein : bis 7o %.

GC-MS : Ein Nachweis im Massensummenspektrogramm war möglich bei einer Präparation von o.5 Microgramm. Kein Hinweis für Zersetzung der Substanz.

5.8 Chlorprotixen

Präparation von 4 Microlitern einer o.1 % methanolischen Lösung. Chlorprotixen wird unter dem Namen Truxal^{R} klinisch als Neuroleptikum häufig verwandt.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen, jedoch mit einem Heizstrom von 7 Ampère
Rel.Ret.-zeit zu Coffein : 2.74
Abs.Ret.-zeit : 1o.3 min
Peakform: Breites Plateau mit aufgesetztem Peak der 5 % der Höhe des Coffeins erreicht.

UV : Extinktionsmaxima: 269 nm, 231 nm
Wiedergewinnungsrate : ca. 15 %
dabei Coffein : bis 8o %.

Auch mit anderen Temperaturprogrammen war keine Verbesserung zu erzielen, da das Säulenmaterial OV 17 für Chlorprotixen nur eingeschränkt geeignet ist.

5.9 Clomethiazol

Präparation von 4 Microlitern der o.1 % methanolischen Lösung. Distraneurin^{R} ist bekannt geworden als Mittel zur Behandlung des alkoholischen Delirs.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen, jedoch mit einem Heizstrom von 5 Ampère
Rel.Ret.-zeit zu Coffein : o.15
Abs.Ret.-zeit : o.9 min
Peakform: Scharfer Peak von knapp halber Höhe des Coffeinpeaks

UV : Extinktionsmaximum (o.1 n H_2SO_4): 257 nm
Wiedergewinnungsrate : 7o %
dabei Coffein : 72 %.

Wegen der Leichtflüchtigkeit der Substanz wurde der Heizstrom um ein Ampère reduziert und die Proben nach Präparation im Kühlschrank aufbewahrt.

5.1o Diazepam

Präparation von 4 Microlitern der Reinsubstanz in o.1 % methanolischer Lösung. Diazepam ist als Valium hinreichend bekannt.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen

Rel.Ret.-zeit zu Coffein : 3.2

Abs.Ret.-zeit : 14.4 min

Peakform: Peak von etwa halber Höhe des Coffeins mit starkem Tailing. Die Auffangzeit betrug deshalb drei Minuten.

UV : Extinktionsmaxima in 2 n HCl : 242 nm, 287 nm.

in 5o % Meth. : 23o nm

Wiedergewinnungsrate : 7o %

dabei Coffein : 7o %

GC-MS : Bei Präparation von nur o.5 Microgramm Diazepam konnte aus dem Aufgefangenen ein Massenspektrum ermittelt werden, welches dem Referenzspektrum entspricht (Abb.13)

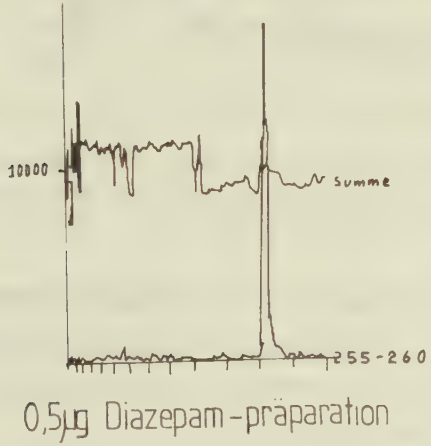


Abb. 13: Massensummenspektrogramm von der Diazepampräparation (obere Linie) mit den für Diazepam typischen Massen von 255 bis 26o (untere Linie).

5.11 Ephedrin

Präparation von 4 Microlitern der Reinsubstanz in o.1 % methanolischer Lösung. Ephedrin ist als Base ausgesprochen leicht flüchtig, der Schmelzpunkt liegt bei 4o °C.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen war schlecht möglich, deshalb:
Ofentemperatur : 16o ° C isotherm
Injektor und Detektor : 22o ° C
Heizstrom 5 Ampère
Rel.Ret.-zeit zu Coffein : o.24
Abs.Ret.-zeit : 1.6 min

UV : Kein Nachweis des Ephedrins möglich
Wiedergewinnungsrate des Coffeins : 75 %

GC : Reinjektion des Präparates. Auffangrate nach Peakhöhe beträgt etwa 3o %, es zeigen sich jedoch zwei weitere Peaks !

Wiederholung der Präparation bei einer Ofentemperatur von 15o °C , Injektor und Detektor 2oo °C und ohne Zusatz des Standards, um eventuelle Überlagerung auszuschließen.

Der relativ breite Peak mit einer Halbwertsbreite von 1.9 Minuten wurde fraktioniert aufgefangen und einzeln reinjiziert. (siehe Abbildung 14).

Abb. 14: Chromatogramm der beiden reinjizierten Fraktionen, in welchen der Ephedrinpeak mit E bezeichnet ist.

Die während der zweiten Hälfte des Peaks aufgefangene zweite Fraktion enthält praktisch kein Ephedrin mehr, sondern nur noch dessen Lyseprodukte (1-3).
Da die Analyse selbst nicht zu einer Zersetzung führt, ist wahrscheinlich das beheizte Metallausführungsrohr für die Zersetzung verantwortlich.

5.12 Hexobarbital

Präparation von 4 Microlitern der Reinsubstanz in o.1 % methanolischer Lösung. Als Evipan^{R} wird diese Substanz häufig für Kurznarkosen verwandt.

GC: Präparation unter Std.-bedingungen.
Rel.Ret.-zeit zu Bromazepam: o.44
Abs. Ret.-zeit : 4.o min.
Scharfer Peak von der Höhe des Bromazepams.

UV: Extinktionsmaximum in basischer Lösung: 245 nm
Wiedergewinnungsrate : 63 %
Wiedergewinnungsrate Bromazepam: 7o %

GC-MS: Die Präparation von o,5 Microlitern Hexobarbital ergab trotz scharfer, deutlicher Peaks bei der Präparation massenspektrometrisch keinen eindeutigen Nachweis von Hexobarbital im Präparat. Die mit vier Microlitern ermittelte Rate kann demnach nicht unmittelbar auf die Präparation von Nanogramm-Mengen übertragen werden, da 63 % von o.5 Microlitern sehr gut nachweisbar sind.

5.13 Imipramin

Präparation von 4 Microlitern der Reinsubstanz in o.1 % methanolischer Lösung. Imipramin ist als Tofranil^{R} ein häufig gegebenes trizyklisches Antidepressivum.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen
Rel.Ret.-zeit zu Coffein : 1.66
Abs. Ret.-zeit : 1o.6 min
Scharfer Peak am Ende eines vorangehenden Plateaus. Die Peakhöhe beträgt etwa die halbe Coffeinpeakhöhe.

UV : Extinktionsmaximum in saurer Lösung : 251 nm
Wiedergewinnungsrate : bis zu 6o %
Die UV-Messung zeigt das für Imipramin typische scharfe Extinktionsmaximum für das Präparat, obwohl die Messung der Originalsubstanz ein verstrichenes Maximum ergab. Möglicherweise wurde hier das Original von Zerfallprodukten "gereinigt".

Kap-GC : Die Wiedergewinnung bei Präparation von o.5 Microgramm ergab eine Auffangrate von nur 1o %.

5.14 Lidocain

Präparation von 4 Microlitern der Reinsubstanz in o.1 % methanolischer Lösung. Lidocain wird als Antiarrhythmicum verwandt und ist als Lokalanästhetikum unter dem Namen Xylocain^{R} bekannt.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen
Rel.Ret.-zeit zu Bromazepam : o.41
Abs.Ret.-zeit : 4.o min
Scharfer Peak von knapp doppelter Höhe des Bromazepams.

UV : Extinktionsmaxima bei 263 nm und bei 278 nm, jedoch für eine quantitative Messung zu gering ausgeprägt.
Wiedergewinnung des Bromazepams: 6o %.

GC : Reinjektionen der Präparate bei gleicher Empfindlichkeit ergaben Peakhöhen von 2o - 3o % der Höhe des aufgefangenen Peaks.

GC-MS : Die Präparation von nur o.5 Microgramm lag gerade über der Nachweisgrenze des Massenspektrometers.

5.15 Lorazepam

Präparation von 4 Microlitern der Reinsubstanz in o.1 % methanolischer Lösung. Als Benzodiazepin ist Lorazepam ein Tranquilizer.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen
Rel.Ret.-zeit zu Coffein : 3.o
Abs.Ret.-zeit : 15.4 min
Einzelner Peak von einem Drittel der Höhe des Coffeins.

UV : Extinktionsmaxima in saurer Lösung: 236 nm und 329 nm
Wiedergewinnungsrate : bis zu 2o %
Rate des Coffeins : 71 %

Kap-GC : Auf der Kapillarsäule ergab das Präparat von 1 Microgramm eine Peakhöhe von nur 5 % der Höhe bei Direktinjektion. Da auch Nebenpeaks auftraten, ist eine thermische Zersetzung wahrscheinlich.

5.16 Methaqualon

Präparation von 4 Microlitern der Reinsubstanz in o.1 % methanolischer Lösung. Als Hydrochlorid ist dieses Schlafmittel am bekanntesten unter dem Namen Revonal^{R}.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen
Rel.Ret.-zeit zu Coffein : 1.74
Abs. Ret.-zeit : 8.o min
Scharfer Peak von etwa zwei Drittel der Höhe des Coffeinpeaks.

UV : Extinktionsmaximum in Methanol : 225 nm, 263 nm, 3o4 nm und 326 nm.
Wiedergewinnungsrate : 8o %
Rate des Coffeins : 8o %

Kap-GC : Trotz guter Ergebnisse im obigen Versuch ergab sich bei der Präparation von nur o.5 Microgramm ein Peak von weniger als 2o % der Höhe bei Direktinjektion der gleichen Menge.

5.17 Morphin

Präparation von 4 Microlitern einer o.1 % methanolischen Lösung.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen, jedoch mit erhöhter Nachweisempfindlichkeit durch höhere Perlenspannung des Detektors.
Rel.Ret.-zeit zu Bromazepam : 1.54
Abs.Ret.-zeit : 15.7 min
Stumpfer Peak mit starkem Tailing, Höhe nur etwa 5 % derer des Bromazepams.

UV : Schwache Extinktionsmaxima bei 25o,5 nm und 296 nm
Wiedergewinnungsrate: Ø
Rate des Bromazepams: 65 %.

Kap-GC : Auch auf der OV 1 beschichteten Säule ist die Gaschromatographie schlecht möglich.

Eine Silylierung des Morphins zur besseren GC-gängigkeit wäre eigentlich nötig, ist aber nicht Sinn dieser Versuchsreihe.

5.18 Parathionmethyl

Präparation von 4 Microlitern der Reinsubstanz in o.1 % methanolischer Lösung.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen
Rel.Ret.-zeit zu Bromazepam : o.46
Abs.Ret.-zeit : 6.o min
Der Peak ist knapp doppelt so breit und von etwa halber Höhe des Bromazepampeaks.

UV : Extinktionsmaximum in Methanol: 275 nm
Wiedergewinnungsrate : 4o %
Rate des Bromazepams : 76 %

Kap-GC : Bei der Präparation von nur 1 Microgramm ergab sich ein Peak von nur etwa 1o % der Höhe, die die gleiche Menge bei Direktinjektion erzielt.

5.19 Pentazocin

Präparation von 4 Microlitern einer o.1 % methanolischen Lösung. Fortral^{R} ist als Analgeticum sowohl in der Klinik als auch in der Rechtsmedizin von größter Bedeutung.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen

Rel.Ret.-zeit zu Coffein : 1.8

Abs.Ret.-zeit : 9.o min

Scharfer Peak von etwa einem Viertel der Höhe des Coffeinpeaks.

UV : Extinktionsmaxima in basischer Lösung : 239 nm, 298 nm

Wiedergewinnungsrate : 6o %

Rate des Coffeins : 58 %

Diese Werte wurden ermittelt aus dem untenstehenden UV-Spektrum:

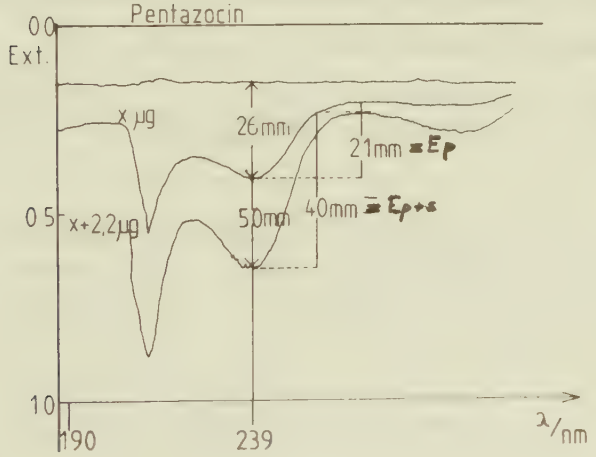


Abb. 15: UV-Spektrum des präparierten Pentazocins (x µg) und der zugefügten Eichmenge Pentazocin (x µg + 2.2 µg)

Wie im Text erläutert, kann die Menge x nach zwei unterschiedlichen Verfahren ermittelt werden.

Als Beispiel der Auswertung dient das UV-Spektrum auf Seite 65 . Die Messung der Absolutextinktion bei 239 nm ergab für die Probe E_p = o.26 (= 26 mm).
Mit dem zugegebenen Standard ergibt sich

$E_{ges} = E_p + E_{std}$ = o.5o, d.h. E_{std} ist gleich o.24.

Bei Rechnung mit Absolutextinktionen ergibt sich die Wiedergewinnungsrate X als $\frac{E_p}{E_{std}} \times \frac{\text{Std.-menge}}{\text{Probenmenge}}$

und beträgt hier o.62, also 62 %.

Bei Reinsubstanzen muß jedoch auch gelten, daß die Differenz zwischen zwei beieinanderliegenden Extinktionsextrema der Konzentration proportional ist

$$X = \frac{\Delta E_p}{\Delta E_{std}} \times \frac{\text{Std.-menge}}{\text{Probenmenge}} = \frac{\Delta E_p}{\Delta E_{p+std} - \Delta E_p} \times \frac{\text{Std.-menge}}{\text{Probenmenge}} = o.61$$

Als Standardmenge wurden 2.2 Microgramm zugesetzt, die Probenmenge war üblicherweise 4 Microgramm.

GC-MS : Die Präparation von nur o.5 Microgramm Pentazocin ergab einen deutlichen Peak im Massensummenspektrogramm.

5.2o Pethidin

Präparation von 4 Microlitern einer o.1 % methanolischen Lösung. Pethidin ist als Hydrochlorid Bestandteil des häufig verwandten Analgeticums Dolantin^{R}.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen
Rel.Ret.-zeit zu Bromazepam : o.32
Abs.Ret.-zeit : 3.4 min
Scharfer Peak von zweieinhalbfacher Höhe des Bromazepams.

UV : Schwache Extinktionsmaxima bei 252 nm, 259 nm und bei 264 n,.
Wiedergewinnungsrate : nicht meßbar
Rate des Bromazepams : 5o %

Die Wiedergewinnungsrate ließ sich UV-spektrometrisch nicht bestimmen, weil im Spektrogramm ein breites Extinktionsmaximum ohne Dreigipfligkeit bei 256 nm auftrat, welches die Reinsubstanz selbst nicht aufwies. Eine thermisch-katalytische Zersetzung ist wahrscheinlich.

GC : Die Wiederholung unter Begrenzung auf höchstens 23o ° C ergab folgendes Ergebnis :

Kap-GC : Die Reinjektion aus der Präparation von einem Microliter der o.1 % Lösung ergab einen Peak von einem Zehntel der Höhe der Direktinjektion, was einer Auffangrate von ca. 1o % entspricht.
Ein Zerfall der Substanz trat nicht mehr auf.

5.21 Phenacetin

Präparation von 4 Microlitern der Reinsubstanz in o.1 % methanolischer Lösung. Phenacetin ist als Analgeticum und Antipyreticum seit langem bekannt.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen, jedoch mit nur 1o °C/min Temperatursteigerung.
Rel.Ret.-zeit zu Coffein : o.72
Abs.Ret.-zeit : 5.1 min
Scharfer Peak von halber Höhe des Coffeinpeaks.

UV : Extinktionsmaximum bei 25o nm
Wiedergewinnungsrate : 45 %
Rate des Coffeins : 75 %

GC-MS : Ein Nachweis von Phenacetin im Präparat aus o.5 Microlitern der o.1 % Lösung gelang nicht. Weder auf der Kapillarsäule mit OV 1 noch im Massensummenspektrum ließ sich die Substanz eindeutig nachweisen.

5.22 Phenobarbital

Präparation von 4 Microlitern der Reinsubstanz in o.1 % methanolischer Lösung. Phenobarbital wird als Luminal^{R} heutzutage hauptsächlich gegen Epilepsien gebraucht.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen
Rel.Ret.-zeit zu Bromazepam : o.57
Abs.Ret.-zeit : 5.6 min
Scharfer Peak von etwa einem Viertel der Höhe des Bromazepams.

UV : Extinktionsmaximum im basischen Medium bei 24o nm
Wiedergewinnungsrate : ca. 1o %.
Rate des Bromazepams: 5o %

Kap-GC : Die Reinjektion des Präparates aus o.5 Microgramm erreichte etwa 1o % der Höhe, die die eingesetzte Menge bei Direktinjektion erzielt hätte. Vor dem Peak des Phenobarbitals zeigten sich hier mehrere zusätzliche Peaks, so daß ein Zerfall der Substanz anzunehmen ist.

5.23 Phenytoin

Präparation von 4 Microlitern der Reinsubstanz in o.1 % methanolischer Lösung. Phenytoin wird als Antiepileptikum und zur Behandlung der Digitalisintoxikation eingesetzt.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen
Rel.Ret.-zeit zu Bromazepam : 1.3
Abs.Ret.-zeit : 11.4 min
Stumpfer Peak von weniger als einem Zehntel der Höhe des Bromazepams.

UV : Schwache Extinktionsmaxima bei 258 nm und 264 nm
Wiedergewinnungsrate nach Messung bei 23o nm: sehr ungenau, unter 2o %.
Rate des Bromazepams : 5o %

Kap-GC : Auf der Kapillarsäule mit OV 1 läßt sich Phenytoin nicht nachweisen. Dennoch zeigte das Chromatogramm der Präparation aus o.5 Microgramm einen Peak, so daß thermokatalytische Zersetzung wahrscheinlich ist.

5.24 Cocain

Präparation von 4 Microlitern der Reinsubstanz in o.1 % methanolischer Lösung. Dieses als Lokalanästhetikum verwandte Alkaloid ist auch als Suchtmittel von Bedeutung.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen
Rel.Ret.-zeit zu Bromazepam : o.8
Abs.Ret.-zeit : 9.8 min
Scharfer Peak von knapp einem Viertel der Höhe des Bromazepams

UV : Extinktionsmaxima in Methanol : 23o nm, 274 nm und 284 nm
Wiedergewinnungsrate : zu schwache Extinktion
Rate des Bromazepams : 73 %

GC-MS : Die Reinjektion des Präparates aus 1 Microgramm ergab auf der Kapillarsäule einen Peak von nur 5 % der Höhe bei Direktinjektion der gleichen Menge. Andere Peaks waren erheblich kleiner. Auffällig ist der deutliche Nachweis der Cocain-spezifischen Kennmassen im Massenspektrogramm : 82, 83 und 182, ohne daß andererseits im Massensummenspektrogramm (in der Abb. 15 als "Summe" beschriftet) ein Peak erkennbar ist!

Abb. 15 Summenspektrum und Einzelmassenplot der Cocainpräparation.

Bei einer Routineuntersuchung wäre also, wenn nicht schon der Verdacht besteht, es handle sich um Cocain, die Substanz nicht bemerkt worden.

Erst bei der spezifischen Suche nach Cocain mittels der Kennmassen 82 und 182 wird das Vorhandensein von Cocain bestätigt.

6. Ergebnisse aus nicht standardisierten Versuchen

6.1 5,5-Diäthylbarbitursäure

Präparation von 4 Microlitern einer 5 mMolaren methanolischen Lösung der Reinsubstanz.

GC : Präparation wie bei Std.-bedingungen, jedoch auf der Glassäule, gepackt mit OV 17.
Abs.Ret.-zeit : 1.8 min.
Peakform plateauförmig mit aufgesetztem Peak.

UV : Extinktionsmaximum im basischen Medium: 24o nm
Wiedergewinnungsrate : 64 %

Im Gegensatz zum Bromazepam, bei dem ein vorheriges Ansäuern der Probe keinen Einfluß auf die Präparation zeigte, ergab sich für Barbitursäuren eine Verbesserung um 3oo % ! Eine Ermittelung der Raten unter Standardbedingungen war deshalb nicht mehr sinnvoll.

Die einmalige Injektion von 1 ul o.1 n H_2SO_4 zeigte auch für nachfolgende Präparationen der nicht angesäuerten Substanz eine Verbesserung.

Bei mehreren Folgeinjektionen ohne H_2SO_4 wurden die Peakhöhen zunächst stetig geringer, blieben aber schließlich deutlich höher als vor der einmaligen Zugabe von Säure.

6.2 1-Phenyl-3-methyl-pyrazolon

Präparation von 5 Microlitern der o.1 % methanolischen Lösung der Reinsubstanz. Es handelt sich um ein Stoffwechselprodukt des Schmerzmittels Aminophenazon.

GC : Präparation unter folgenden Bedingungen:
Injektor und Detektortemperatur : 28o °C
Ofen : 18o °C isotherm
N_2-Fluß : 4o ml/min
Präparation auf der Glassäule (s.Kap.3.1.1) 2o8 cm.
Kühlung der Sammelgefäße in einem Eisbad aus gemahlenem Eis und Calciumchlorid.
Sonstiges wie unter Std.-bedingungen
Abs.Ret.-zeit : 4.9 min

UV : Extinktionsmaxima bei 241 nm und 267 nm.
Wiedergewinnungsrate : 7o %.

6.3 Diphenhydramin

Präparation von 5 Microlitern einer o.1 % methanolischen Lösung der Reinsubstanz. Klinisch ist das Hydrochlorid als Antihistaminikum wirksam.

GC : Präparationsbedingungen wie unter 6.2
Abs.Ret.-zeit : 2.4 min
Rel.Ret.-zeit zu Coffein: o.73
Scharfer Peak in gleicher Höhe wie Coffein

UV : Schwache Extinktionsmaxima : 252 nm, 258 nm und bei 264 nm
Wiedergewinnungsrate nach Messung außerhalb der Maxima : ca. 7o %.

Da die Maxima wenig ausgeprägt waren, bestand die Chance, daß schon geringe Verunreinigung mit Coffein einen erheblichen Meßfehler verursacht hätte.

6.4 Antipyrin

Präparation von 5 Microlitern der o.1 % methanolischen Lösung der Reinsubstanz. Antipyrin ist ein Analgeticum und Antipyreticum.

GC : Präparationsbedingungen wie unter 6.2
Abs.Ret.-zeit : 5.2 min
Scharfer Peak in gleicher Höhe wie Coffein

UV : Extinktionsmaxima in Methanol : 265 nm, 241 nm
Wiedergewinnungsrate : 7o %.

6.5 Phenylbutazon

Präparation von 4 Microlitern der o.1 % methanolischen Lösung der Reinsubstanz, die klinisch als Antiphlogisticum häufig Verwendung findet.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen, jedoch mit einer Injektortemperatur von 26o °C, einem Heizstrom von 5,6 A und ohne Referenz.

Abs.Ret.-zeit : 15 .o min
Peak mit Tailing von einem Viertel der Höhe des Bromazepams

UV : Extinktionsmaximum bei 265 nm
Wiedergewinnungsrate : bis zu 3o %,mit starker Streuung der Ergebnisse.

Kap-GC : Nachweis zumindest eines zusätzlichen Peaks unbekannter Herkunft. Auffangrate der unzerstörten Originalsubstanz, nach Peakhöhe geschätzt, unter 5 %.

Auch andere Temperaturprogramme erbrachten keine reproduzierbaren Verbesserungen. Diese Substanz muß als sehr schwierig eingestuft werden.

Eine in Vorversuchen mit einer 1o8 cm langen, frisch gefüllten Glassäule erreichte Auffangrate von 16 % war im nachhinein nicht reproduzierbar zu wiederholen.

7. V e r s u c h e mit Hochtemperaturprogramm

7.1 Dextromoramid und Fenetyllin

Präparation von je 4 Microlitern der o.1 % methanolischen Lösung der Reinsubstanzen.
Fenetyllin hat als Captagon^{R} in letzter Zeit erhebliche Bedeutung als Suchtmittel erlangt.

GC : Präparation mit Gasdruckeinstellungen wie bei Std.-bedingungen
Detektortemperatur : 3oo °C
Injektortemperatur : 27o °C
Ofentemperatur : 22o °C + 1o°C/min bis 28o °C
Heizstrom : 7 Ampère

Dextromoramid : Auch nach 3o Minuten kein sicherer Peak

Fenetyllin : Nach 19 Minuten zeigt sich ein kleiner Peak von nur einem Sechzehntel der Höhe des Bromazepams.

Bei wiederholter Injektion tritt "Bahnung" auf, d.h. der letzte von fünf Peaks ist mehr als doppelt so hoch wie der erste (vergl. Kap. 9.3.4).

Kap-GC : Im Kapillarchromatogramm erscheint ein scharfer Peak und geringe zusätzliche Spitzen.
Die Höhe des Peaks entspricht jedoch nur einer Wiedergewinnungsrate von ca. 1 %.

Eine Wiederholung der Versuche nach Tests auf Trennschärfeverlust oder Verstopfung des Gasteilers ergab keine Verbesserung.

Nach weiteren Versuchen mit Niphenazon und Verapamil , die analytisch im Hochtemperaturbereich nachweisbar sind, wurde dieser Temperaturbereich wegen allzu schlechter Ergebnisse verlassen.

8. Trennung zweier Reinsubstanzen

8.1 Coffein und Clomethiazol:

Präparation der jeweils o.o5 % Lösung von Coffein und Clomethiazol als Gemisch.

GC : Präparation unter Std.-bedingungen
Abs.Ret.-zeit Coffein : 5.2 min
Abs.Ret.-zeit Clomethiazol : 1.2 min
Jeweils scharfer Peak ohne nennenswertes Tailing

UV : Wiedergewinnung Coffein (273 nm) : 7o %
Rate für Clomethiazol (249 nm) : 7o %

GC : Reinjektion der Präparation aus 4 Microlitern Gemisch ergab das auf der folgenden Seite abgebildete Chromatogramm (Abb.16).

Nach Peakhöhe gemessen ergeben sich auch hier Auffangraten von etwa 8o %.

Die jeweilige Fremdsubstanz ist auf etwa 1o % des Ausgangswertes reduziert.

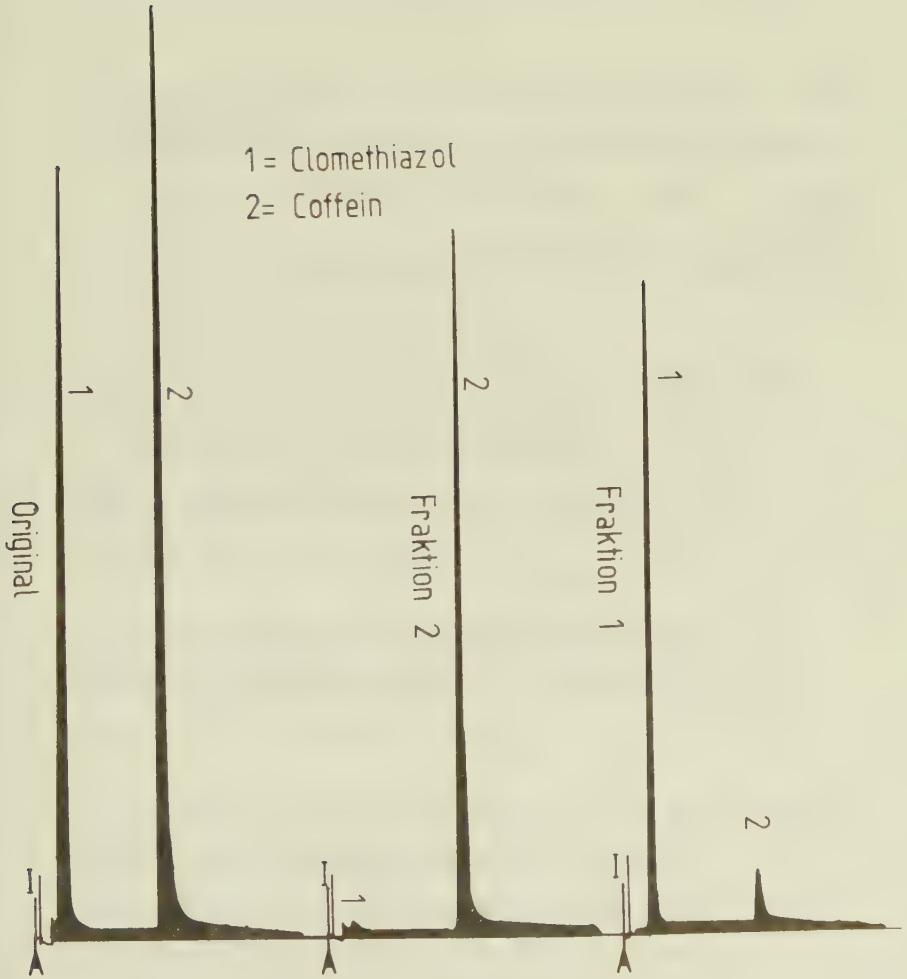


Abb. 16: Trennung von Clomethiazol und Coffein.
Links das Chromatogramm des Gemisches aus 1 und 2.
Mitte und Rechts die jeweils isolierte Substanz.

9. I s o l a t i o n von Clomethiazol aus Leberextrakt

Zunächst wurde neben der genauen Retentionszeit auch der spezifische Detektorausschlag pro injiziertem Microgramm Substanz bestimmt, um halbquantitative Aussagen treffen zu können.
Die Reinsubstanz läßt sich gut wiedergewinnen (Kap.5).

GC : Die Kleinstmengen (unter 1oo ng/Microliter), die in dem Leberextrakt eines aktuellen Falls sicher identifiziert wurden, konnten aufgefangen werden und bei Reinjektion eines Präparates aus 2 Microlitern = ca. 2oo ng mit dem NFID sicher nachgewiesen werden.
Die Peakhöhe schwankte um den Faktor drei.
Die geschätzte Wiedergewinnungsrate lag unter 2o %.

GC-MS : Das Massenspektrum zeigt einen nur fraglich als Clomethiazolderivat zu identifizierenden Peak. Da gaschromatographisch mit dem NFID ein Nachweis der Präparation gelungen war, wurde angesichts der diskutierten Praktikabilitätsprobleme (Kap. 1o,7) die Fehlersuche nicht weiter betrieben.

1o. Diskussion der Ergebnisse

1o.1 Stoffauswahl

Die getesteten, mit einer Ausnahme pharmazeutischen Präparate sind so ausgewählt, daß die meisten toxikologisch wichtigen Verbindungen jeweils durch mindestens eine beispielhafte Substanz vertreten sind. Es wurde Wert darauf gelegt, sowohl Wirkstoffe mit kurzen Retentionszeiten zu erfassen, als auch solche, die erst im Hochtemperaturprogramm nachweisbar sind. Basische Stoffe sollten ebenso wie saure mitgetestet werden.

Die vorgestellte Auswahl kann somit als kleiner, repräsentativer Querschnitt des Gesamtgutes der toxikologisch nachzuweisenden Substanzen gelten.

Im Durchschnitt aller dieser GC-gängigen Stoffe ergibt sich eine mittlere Auffangrate von 44 %.

1o.2 Methodisch bedingte Einschränkungen

Bei der Bewertung dieses Durchschnitts ist zu berücksichtigen, daß die vorgestellte, für die Routine gedachte Methode

naturgemäß nur einen Kompromiß darstellen kann, da der physikalisch-chemischen Eigenart der Substanzen nur bedingt Beachtung geschenkt werden konnte.

So ließ sich etwa die Präparation der 5,5-Diäthylbarbitursäure nur in sinnvollem Maße ermöglichen, nachdem die Säulenbeschichtung mit einer Säure (H_2SO_4) angesäuert worden war.

Ebensowenig kann bei einer Routinepräparation der besonderen Leichtflüchtigkeit etwa von Ephedrin Rechnung getragen werden, da es nicht Aufgabe war, möglichst gute Einzelwerte zu erzielen, sondern abzuschätzen, ob eine einfache Routinemethode den praktischen Anforderungen gerecht werden kann.

1o.3 Apparative Voraussetzungen

Es wurde schon in vorhergehenden Abschnitten auf die Diskrepanz zwischen theoretisch zu fordernden Apparaturen und der tatsächlichen Ausrüstung hingewiesen. Der Umbau am GC betrifft ein funktionstüchtiges, jedoch für Präparation nicht vorgesehenes Gerät, mit dem unter geringem finanziellem Aufwand ein klar umrissenes Ziel erreicht werden soll.

Die als Prototyp entstandene Umrüstung dient zur Beurteilung des Nutzens und der Praktikabilität eines einfachen zusätzlichen Analyseverfahrens, das in dieser Form noch nicht versucht wurde. Diese Beurteilung ist möglich, auch wenn man berücksichtigt, daß durch Verbesserungen des Injektorteils, durch Ausschaltung katalytisch wirksamer Lötstellen am Auslaßrohr oder durch Optimierung der Sammelkapillare, eine deutliche Erhöhung der Anwendungsbreite und der Genauigkeit der Ergebnisse möglich sein wird.

1o.4 Handhabung und Fehlerquellen

Die aufwendige Durchführung der Präparation auf dem als Prototyp erstellten GC ist in der beschriebenen Form noch nicht in die Alltagsroutine einzubinden. Die beschriebenen Experimente zeigen die Störmöglichkeiten auf.

So verzichtet der beschriebene Prototyp beispielsweise auf einen professionellen Sammelkapillarenwechsler, wie er im theoretischen Teil beschrieben ist. Das hat zur Folge, daß die einzelnen Fraktionen nur dann sauber getrennt werden, wenn durch Routine des Bedieners der manuelle Wechsel der Sammelkapillare, d.h. das Herausdrehen der Caps aus der Silikonschlauchkupplung und schnelles Wiedereinsetzen des neuen Caps,reibungslos abläuft.

Oxidation:

Häufige Probleme der GC, wie das Auftreten von Undichtigkeiten oder die chemische Veränderung der Säulenbeschichtung durch aggressive Stoffe, was die Neufüllung und Konditionierung der Säule nach sich zieht, erschweren die Arbeit mit CC allgemein.

Speziell bei der vorgestellten Apparatur jedoch ergeben sich Schwierigkeiten durch die regelmäßige Oxidation der kupfernen Klemmverbindung und des Ableitrohres, da diese Stellen immer geheizt werden. Die Oxidschicht an der Klemmverbindung sorgt durch Erhöhung des lokalen Widerstandes (s.Kap. 4.3) für eine zusätzliche Überhitzung mit konsekutiver, verstärkter Oxidation.
Bei dem beschriebenen Sammelgefäßwechsler (Kap.2.2.3) wird dieses Problem umgangen, indem die Auslaßöffnung in einen thermostatisch beheizbaren Metallblock verlegt ist.

Ein Versuch, die oxidierende Klemmverbindung durch Anlöten eines feinen Silberdrahtes zu ersetzen, scheiterte an einer nicht genügend klein herzustellenden Lötstelle: Das Silberlot hat zu geringen elektrischen Widerstand bei zu guter Wärmeleitfähigkeit, was zu einer lokalen Kaltstelle führt. Ein Lot aus anderem Metall hätte die Weichmetalllegierung des Ableitrohres schmelzen lassen.

1o.5 Thermolyse und Katalyse

Die beschriebene Oxidation führt bei katalysegefährdeten Stoffen, wie etwa Ephedrin, zu einer Zersetzung an den heißen Metallwänden, deren Oberfläche durch Oxidation vergrößert wird und oft katalytisch wirksamer ist als das Reinmetall.
Außerdem führt Oxidation im Gasmengenteiler zusammen mit feinsten Schmutzpartikeln zu einer Verlegung der sehr engen Gaswiderstandsstrecken, was nach einem Jahr eine erhebliche Erhöhung des Gasdruckgefälles an dem Teiler bewirkt hat.
Anfangs beseitigte eine Waschung und Druckluftreinigung die Verstopfung, gegen Ende der Versuchsreihe mußte ein neuer Teiler eingesetzt werden. Schwankungen der absoluten Retentionszeiten der Referenzsubstanzen, auch wenn sie auf den gleichen Säulen ermittelt wurden, sind darauf zurückzuführen.

1o.6 Dichtungen

Undichtigkeiten im System waren anfangs bei Verwendung von Teflondichtungen eine relativ häufiger auftretende Ursache für mangelhafte Auffangraten; mit Verwendung der teureren Graphitdichtungen ist dies kein Problem mehr.

1o.7 Praktikabilität

a) Routinemethode

Ein generelles Problem bei Verwendung einer Routinemethode zur Suche nach einem unbekannten Stoff ist die fragliche Temperaturstabilität und Katalysegefahr. Bei der getesteten Routinemethode auf der vorgestellten Apparatur muß nach den Erfahrungen mit Ephedrin damit gerechnet werden, daß eine sensible Substanz teilweise zersetzt werden kann. Optimieren, wenn auch nicht völlig beheben, läßt sich diese Angelegenheit nur durch eine "all-glas" Konfiguration, wie sie von MAGIN (1978) beschrieben wird. Der technische und finanzielle Aufwand ist dann allerdings erheblich.

b) Bahnung

Eine Schwierigkeit von ganz anderer Seite besteht in einer erheblichen Verschlechterung der Auffangrate einiger Stoffe bei Übergang von einigen Microgramm auf Mengen unter 5oo ng. So läßt sich das schwer GC-gängige Chlorpromazin (Kap.5.7) in Microgrammengen zu etwa 25 % wiedergewinnen, unter 1 µg jedoch ist schon ein Detektornachweis kaum möglich. In diesem Fall gelingt nur massenspektrometrisch der Nachweis, daß überhaupt Spuren dieser Substanz aufgefangen werden können.

Dieser Effekt einer "Bahnung" mit größeren Mengen läßt sich auch bei anderen schlechtgängigen Substanzen, wie etwa dem unsubstituierten Morphin, beobachten: Nur bei wiederholter Injektion oder bei Darstellung größerer Mengen gelangt die Substanz ohne zu große Reduktion über die Säule. Als Ursache kommen unspezifisch aktive Stellen des Säulenmaterials in Frage, die jeweils erst gesättigt werden müssen. Dieser Effekt birgt den Unsicherheitsfaktor, daß eine gesuchte, noch unbekannte Substanz in ebenso unbekanntem Maße teilweise absorbiert wird, und so eventuell dem Nachweis entgeht.

Die vorgestellte Routinemethode ohne Optimierung der Präparationsbedingungen für die jeweils nachzuweisende Substanz kann aber für schon getestete Substanzen eine sichere Aussage treffen, da bei diesen Substanzen eine etwaige Temperaturempfindlichkeit, Absorption oder katalytische Zersetzung bekannt ist.

1o.8 Ergebnisse anderer Autoren

Eine weitgehende Elimination von Fehlerquellen haben KLIMES et al. (1977) erreicht, indem sie eine GC-Kombination ganz ohne Kontakt von Metallteilen mit dem Trägergas verwenden. Auch der Gasflußteiler ist aus Glas und stufenlos variierbar, gesammelt wird die Probe in einer Spezialkapillare, deren

Lumen mit Glaswolle gestopft wird, so daß durch Verwirbelung ein vollständiger Niederschlag der Substanz erreicht werden kann. Der Injektor wiederum kann die ganze Kapillare aufnehmen, und die Substanz steht nach Zertrümmerung der Kapillare quantitativ zur Verfügung.
Es entfallen somit jene Fehlerquellen, die auf Absorption an Spritzenwänden, Verdünnung oder Katalyse zurückzuführen sind.
Die Autoren beschreiben dementsprechende Wiedergewinnungsraten um 9o % bis zu 1oo %.

1o.9 Wertung der Ergebnisse

Selbst wenn jedoch eine nahezu 1oo%ige Wiedergewinnung auch für unbekannte Substanzen sicher gelänge, ist die angestrebte Erleichterung bei der Zuordnung fraglicher Peaks am NFID zu denen des Massenspektrometers nicht immer gegeben. Ein Beispiel für die auftretenden Schwierigkeiten bietet die Präparation von Cocain, siehe Abb. 15.
Obwohl dort im Massenspektrogramm anhand der Kennmassen eindeutig Cocain nachweisbar ist, und dieses am NFID auch als deutlicher Peak erscheint, ist im Massensummenspektrogramm an der Stelle, wo Cocain einen Peak erzeugen müßte, kein positiver Ausschlag sichtbar.
So bleibt auch bei guter Auffangrate die sichere Zuordnung in Einzelfällen problematisch.

11. Zusammenfassung

Die gaschromatographische Analyse allein ist zur sicheren Identifikation einer rechtsmedizinisch wichtigen Probe nicht hinreichend.
Beim Vergleich mit anderen Analyseverfahren muß jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit nachgewiesen sein, daß ein in Frage stehender GC-Peak überhaupt von derselben Substanz herrührt, die mit anderen Verfahren identifiziert wurde.

Ein theoretisch naheliegender Weg ist die gaschromatographische Isolierung eben dieses Peaks, um diesen dann selektiv weiteren Meßmethoden zuführen zu können. Zu diesem Zweck wurde der analytische GC F 2o FE der Firma Perkin Elmer eigenständig so umgebaut, daß damit präparatives Arbeiten möglich ist.
Damit wurde ein Verfahren geschaffen, die bei der gaschromatographischen Untersuchung nachgewiesenen aber noch nicht identifizierten Stoffe isoliert aufzufangen, um sie dann weiteren analytischen, insbesondere spektroskopischen Methoden zuzuführen.

Ziel der Arbeit war es, durch Präparation einer repräsentativen Auswahl von Stoffen grundsätzlich zu klären, ob diese Methode in der Routine eines toxikologischen Labors zur Identifikation unbekannter GC-Peaks hilfreich ist.

Der vorhandene analytische GC wurde zunächst durch Einbau eines beheizten Gasteilers, an den ein beheizbares Ausführungsrohr angeschlossen ist, für präparatives Arbeiten umgerüstet. Hierzu mußten sämtliche Gasdrucke angepaßt werden, das Ausführungsrohr von Kaltstellen befreit werden und ermittelt werden, ob Stoffe unzerstört die zusätzliche Strecke zurücklegen können.

Nach ausführlichen Tests auf Nachweisempfindlichkeit, Arbeitsgasdrucke und erforderliche Temperaturprogramme, wurde anhand der Präparation von etwa dreißig Reinsubstanzen bewiesen, daß eine Präparation mit diesem Prototyp eines präparativen Gaschromatographen durchführbar ist.
Die mittlere Wiederfindungsrate aller getesteten Stoffe beträgt 44 %.
Für die verlustarme Überführung geringer Substanzmengen zum Massenspektrometer wurde eine auf die Gegebenheiten speziell zugeschnittene Methode erarbeitet.
Zur Kontrolle der Wiedergewinnungsrate war, wenn möglich, eine UV-spektrometrische Messung angeschlossen.

Es konnte gezeigt werden, daß die Trennung von Reinsubstanzen gut möglich ist.
Die Trennung einer Substanz aus einer Körperflüssigkeit ist bedingt möglich.
Der Vergleich der Nachweisempfindlichkeit zeigt keine Verbesserung gegenüber der unmittelbaren Analyse mit der Kombination Kapillarsäule - Massenspektrometer.

Die Zuordnung von einzelnen Peaks am NFID zu denen des FID oder zu Ergebnissen der Massenspektrometrie wird bis auf die beschriebenen Ausnahmen erleichtert.

Insgesamt zeigt sich, daß die Identifikation einer unbekannten Substanz nur bei Stoffen möglich ist, deren Wiedergewinnungsraten bekanntermaßen gut sind.

12. Literaturverzeichnis

1.) BAYER E., HUPE K.P. und MACK H.
"Filling of Analytical and Preparative Columns for Gas Chromatography"
Analytical Chemistry, Bd. 35, 492 ff, (1963)

2.) CLARKE E.G.C (Ed)
"Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material".
Pharmaceutical Press, London (1969)

3.) DALDRUP T., SUSANTO F., MICHALKE P.
"Kombination von DC, GC (OV1 und OV17) und HPLC (RP18) zur schnellen Erkennung von Arzneimitteln, Rauschmitteln und verwandten Verbindungen".
Fresenius Z. Anal. Chem. Bd. 3o8, 413-427 (1981)

4.) DIXMIER M.-B., ROZ B. et GUIOCHON G.
"Etudes theoriques et pratiques sur la realisation et la fonctionnement de colonnes preparatives de diametre moyen"
Analytica Chimica Acta, Bd. 38, 73 ff (1967)

5.) FRISONE Gino J.,
"The design and construction of a Two-Inch Preparative Gas Chromatographic Column".
Journal of Chromatography Bd. 6, 97 (1961)

6.) GIDDINGS J.C.,
"Dynamics of Chromatography" Part I,
Marcel Dekker, New York (1965)

7.) GROB Robert L.,
"Modern Practise of Gas Chromatography"
Wiley Interscience, New York (1977)

8.) HUPE K.-P.
"Outlet System" S. 143 ff in: Zlatkis (Ed) "Preparative Gas Chromatography"
Wiley Interscience, New York (1971)

9.) KAISER R.
"Chromatographie in der Gasphase"
Bd. 1 "Gaschromatographie",
B.I. Wissenschaftsverlag , Mannheim (1973)

1o.) KLIMES I., STÜNZE W. und LAMPARSKY D.
"Nanogramm-Verfahren. II. Präparative Gaschromatographie im Mikromaßstab".
Journal of Chromatography, Bd. 136, 23 ff (1977)

11.) LEIBNITZ E., STRUPPE H.G.
"Handbuch der Gaschromatographie"
Verlag Chemie GmbH , 161 ff, (1967)

12.) MAGIN Donald F.
"A variable all-glass effluent splitter for dual-detector operation and collection of GC-fractions"
Chromoatography Newsletter Bd.6, Nr. 3,(Okt.1978)

13.) PECSAR Raymond E.
"Preparative Column Technology" S. 73 ff in:
Zlatkis (Ed) "Preparative Gas Chromatography"
Wiley Interscience, New York (1971)

14.) PRETORIUS V., De CLERK K.
"Basic Theory" , S. 5ff in: Zlatkis (ed) "Preparative Gas Chromatography"
Wiley Interscience, New York (1971)

15.) SZEPESY L.
"Gas Chromatography", Translated by E.D. Morgan, 327 - 333, Iliffe Books LTD., London (197o)

16.) ZLATKIS A. (Ed)
"Preparative Gas Chromatography"
Wiley Interscience, New York (1971)

Für die Überlassung des Themas, die ständige Ansprechbarkeit und die zugleich befruchtende aber nicht einengende Betreuung meiner Arbeit danke ich ganz besonders Herrn Dr. Thomas Daldrup.

Herrn Dr. Mathiessen möchte ich danken für die freundliche und schnelle Durchführung der Massenspektrometrischen Kontrollen meiner Präparationen und für einige wertvolle Anregungen aus seiner jahrelangen Erfahrung mit der Kombination GC-MS.

Für praktische Ratschläge und technische Hilfe danke ich Herrn Dipl-Ing. Susanto, der mir mit technischem Sachverstand auf dem Gebiet der Gaschromatographie ein wertvoller Gesprächspartner war.

Eine besondere Erwähnung verdienen die jederzeit hilfsbereiten medizinisch-technischen Assistentinnen des rechtsmedizinischen Instituts, die mir eine zügige Durchführung meiner praktischen Arbeit nach Kräften erleichterten.

Uwe Brinkmann
Averkampstr. 3
44oo Münster

L e b e n s l a u f

1956	geboren in Neuss, Eltern: Dr. Roswitha Brinkmann Dr. Jürgen Brinkmann
1963	Einschulung und bis
1975	Besuch der Volksschule und des naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Solingen bis zum Abitur
Jan. 1975	Freistellung von der Bundeswehr
Juni 1975	Abitur
seit Okt.1975	Medizinstudium an der Universität Düsseldorf
seit 1976	Förderung durch die Studienstiftung des deutschen Volkes
1977 u. 1978	Praktische Laborarbeit an Herzmuskelzellkulture im Institut für Klinische Physiologie, Universität Düsseldorf
Aug. 1979	Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit
März 1981	2. Staatsexamen
Mai 1982	3. Staatsexamen
3. Juni 1982	Ärztliche Approbation
seit 1.8.1982	Assistenzarzt an der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster